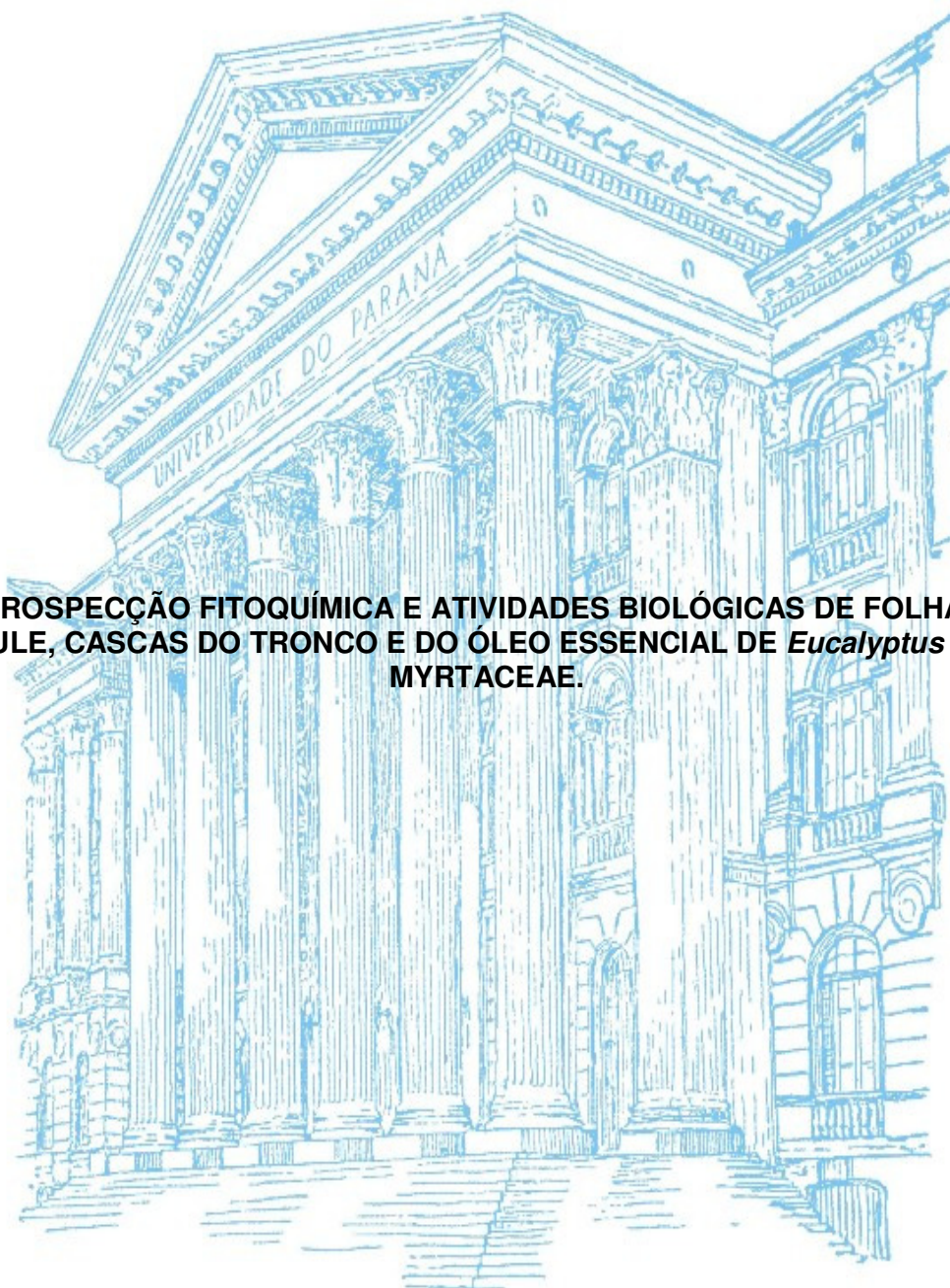


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

ANA CAROLINA PAREJA LOBO

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOLHAS,
CAULE, CASCAS DO TRONCO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus elata*,
MYRTACEAE.**



**CURITIBA
2014**

ANA CAROLINA PAREJA LOBO

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOLHAS,
CAULE, CASCAS DO TRONCO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus elata*,
MYRTACEAE.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tomoe Nakashima

**CURITIBA
2014**

Lobo, Ana Carolina Pareja

Prospecção fitoquímica e atividades biológicas, caule, cascas do tronco e do óleo essencial de *Eucalyptus elata*, Myrtaceae /Ana Carolina Pareja Lobo – Curitiba, 2014.
135 f.: il; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014

Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus elata*. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade hemolítica. 5. Óleo essencial. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.42

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA PAREJA LOBO

Título: "PROSPECCÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOLHAS, CAULE, CASCAS DO CAULE E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus elata*, MYRTACEAE"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Profª. Dra. Tompe Nakashima
Orientadora

Prof. Dr. Sandro Germano
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 07 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho a minha mãe, Carmen Langaro Pareja
E a minha avó, Anete Langaro
As maiores incentivadoras desta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, me iluminando, abençoando e guiando os meus passos nesta jornada.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, pelo incentivo e pelo o amor recíproco que nos fortalecem todos os dias.

À minha mãe, Carmen Langaro Pareja, minha companheira, guerreira, exemplo de mãe, incentivadora, principalmente pela compreensão e auxílio em todos os momentos, tornando este objetivo mais fácil por estar ao seu lado.

À minha avó, Anete Langaro, a pessoa mais iluminada que conheço, que me trouxe paz sempre que solicitei e pelo exemplo de ser humano ao qual sempre me espelho, simplesmente não tenho palavras para dizer o quanto sou grata à Deus por tê-la em minha vida.

Ao meu irmão, Paulo Henrique Pareja Lobo, pelo amor incondicional, pelos pensamentos positivos e pela alegria contagiante que sempre desperta.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima, pelo acolhimento, orientação, amizade, paciência e carinho. Pela oportunidade de participar no seu projeto de pesquisa e desenvolver este trabalho. Muito obrigada pela confiança depositada e pelos conselhos, profissionais e pessoais.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Fabio Murakami, pela acolhida e abertura no Laboratório de Controle de Qualidade II, para a realização dos ensaios microbiológicos.

Aos Professores Dr. Geraldo Picheth e Dr. Railson Henneberger, pelo empréstimo das micropipetas multicanais e demais equipamentos para a realização das análises microbiológicas.

À Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth, pela abertura do Laboratório de Bacteriologia Clínica.

Ao Professor Dr. Wesley Mauricio de Souza, pelo auxílio na realização dos ensaios de difusão em ágar e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Vitor Vlnieska, técnico do Laboratório de Controle de Qualidade II, pela amizade, companheirismo, paciência, carinho e, dos bons momentos e auxílio na realização dos testes microbiológicos.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo, farmacêutica da Central Analítica, pela simpatia, amizade e pelos ensinamentos transmitidos.

À MSc. Grazielle Franco Mancarz, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivadora deste trabalho. Obrigada pelo auxílio, pelas conversas, pela evolução em minha bagagem intelectual, nas discussões e abordagens sobre as metodologias. Pelo companheirismo em todos os momentos, pelos almoços em excelente companhia, inclusive fora da Universidade.

À todos os colegas, de mestrado e doutorado, sob orientação da Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima: Priscila G. Sieben, Mariáh Brandalise Baril, Bárbara Moriel, Stella M. Siu Ló, Sayonara M. Silva e Antônio Waldir C. da Silva, pela amizade e companheirismo, durante a realização deste trabalho.

E também aos estagiários: Allan V. F. Lourenço (IC), Andréa Beatriz Alves, Simone Yae Abe (IC), Suelen Carla Nichelle, Marina W. Pereira, Maria Eduarda A. Maul e Sabrina Freitas de Oliveira (IC), pelo auxílio nos experimentos e pela convivência diária que tornava o nosso local de trabalho mais animado.

Aos meus amigos e amigas que a vida teve o prazer de me presentear pela amizade verdadeira, pelo conforto, por deixarem sempre os momentos de aperto mais leves e pelo apoio na realização desta jornada, cujo auxílio emocional foi de suprema importância, aos quais pretendo continuar cultivando a amizade por toda a minha vida.

Aos meus alunos que são essenciais na minha carreira, que me incentivam diariamente a me tornar uma profissional cada vez mais qualificada e digna da confiança a mim empregada, obrigada por fazerem me sentir uma pessoa privilegiada e profissionalmente realizada.

Aos servidores e funcionários da UFPR.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

O presente estudo descreve a análise fitoquímica, bem como algumas análises biológicas do óleo essencial, extratos de folhas, caule e cascas do tronco de *Eucalyptus elata*, espécie de origem australiana, porém cultivada e adaptada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. O seu principal uso reside na madeira de excelente qualidade que a espécie fornece, sendo a mesma utilizada para a produção de celulose e papel, pela indústria de madeira serrada e laminada, e por apresentar rápido crescimento pode ser utilizada para o reflorestamento. A espécie produz grandes quantidades de óleo essencial, fato também relacionado com outras espécies do mesmo gênero. Porém, não foram encontrados estudos na literatura a respeito de sua composição química, bem como, das atividades biológicas que seus extratos e óleo essencial poderiam apresentar. O intuito desta pesquisa foi realizar a abordagem fitoquímica de diferentes partes da planta, para investigar os metabólitos presentes e a possível atividade biológica de *E. elata*. O material vegetal foi coletado no período do outono na Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Paraná. Pela técnica de hidrodestilação foi realizada a extração do óleo essencial, na qual foi obtido um rendimento de 5,4 mL% de óleo essencial nas folhas secas e de 2,7 mL% nas folhas frescas. A análise fitoquímica, realizada com os extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas, caule e cascas do tronco, revelaram a presença de flavonóides, taninos hidrolisáveis e condensados, leucoantocianidinas, aminogrupos, ácidos fixos, esteróides e/ou triterpenos, saponinas e glicosídeos antociânicos. Pelo método do fosfomolibdênio, o padrão-referência ácido gálico foi o que apresentou a maior capacidade antioxidante total, bem como a maior porcentagem de atividade antioxidante relativa, seguido da fração acetato de etila das cascas e, sendo superior ao padrão-referência rutina. Entretanto, pelo método do DPPH, a fração butanol das folhas e o extrato bruto das cascas mostraram um maior valor de porcentagem de atividade antioxidante, valor este superior aos encontrados para os padrões-referência, ácido ascórbico, rutina e ácido gálico. Neste mesmo ensaio, a fração acetato de etila das folhas revelou o valor de CE_{50} próximo aos encontrados para os padrões-referência. Na avaliação da atividade antimicrobiana utilizando oito cepas comumente estudadas, sendo destas quatro bactérias gram-positivas, gram-negativas e quatro espécies de leveduras, para o método da difusão foi obtido resultado positivo apenas para o óleo essencial. Pela metodologia da microdiluição, os extratos exibiram atividade antimicrobiana, mas com valores de CIM apresentando uma atividade moderada a fraca em todos os casos. Para a avaliação da atividade hemolítica, foi realizado o teste da difusão em agar sangue, no qual o óleo essencial foi o único capaz de provocar a formação de halos de hemólise, entretanto, pelo ensaio em tubos de sangue, nenhuma das amostras provocou rompimento dos eritrócitos. Avaliando os resultados obtidos, são recomendados estudos adicionais visando à utilização desta espécie como um fitoterápico e matéria-prima para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Eucalyptus elata*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade hemolítica, óleo essencial.

ABSTRACT

The present study describes the phytochemical analysis, as well as some biological analyzes of the essential oil, extracts of leaves, stems and the trunk's bark of *Eucalyptus elata*, species of Australian origin, but adapted and grown in the South and Southeast of Brazil. Its main use lies in the wood of excellent quality that provides the species, being the same used for the production of pulp and paper industry of lumber and laminate, and because of its rapid growth, can be used for reforestation. The species produces large amounts of essential oils, fact also related to other species of the same genre, but no studies were found in the literature regarding its chemical composition, neither biological activities of its extracts and essential oil could present, being thus, the aim of this research was to perform phytochemical screening of different parts of the plant, to investigate the metabolites present in them and the possible biological activity of *E. elata*. The plant material was collected in the autumn at Embrapa Forestry, located in the city of Colombo Curitiba's metropolitan region, Paraná. The essential oil was extracted by hydrodistillation technique, which was obtained in a yield of 5.4 mL% essential oil in dry leaves and 2.7 mL% in fresh leaves. Phytochemical analysis, performed with the hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves, stems and bark of the trunk, revealed the presence of flavonoids, hydrolysable tannins and condensed leucoanthocyanidins, amino groups, fixed acids, sterols and / or triterpenes, saponins, glycosides and anthocyanin. By the method of phosphomolybdenum the standard reference gallic acid showed the most antioxidant capacity as well as the highest percentage of relative antioxidant activity, followed by ethyl acetate fraction of the bark and, above the standard reference rutin. However, by the DPPH method, the butanol fraction of crude extract of leaves and bark showed a higher percentage of antioxidant activity, higher than those found for the standard references, ascorbic acid, gallic acid and rutin. In this same test, the ethyl acetate fraction of the leaves showed the EC₅₀ value close to that found for the standard-reference. In the evaluation of antimicrobial activity using eight strains commonly studied, and these four gram-positive bacteria, gram-negative and four species of yeast, for the diffusion method, the only positive result was obtained with the essential oil. However, the microdilution methodology, the extracts also exhibited antimicrobial activity, but with MIC values showing a moderate to weak activity in all cases. To evaluate the hemolytic activity, a test was realized with the blood agar diffusion, in which the essential oil from the dried leaves was the only one capable of causing the formation of halos of hemolysis, however, with the test tubes of blood, none of the samples caused disruption of erythrocytes or showed hemolytic activity. Evaluating the results, additional studies are recommended to use this species as an herbal medicine and raw materials for the pharmaceutical industry.

Key words: *Eucalyptus elata*, antioxidant activity, antimicrobial activity, hemolytic activity, essential oil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO NATURAL DE <i>Eucalyptus</i>	27
FIGURA 2 – NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES	34
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.....	35
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL	35
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA.....	35
FIGURA 6 – TANINO GÁLICO (β -1,2,3,4,6 –PENTAGALOI-D-GLICOSE)	37
FIGURA 7 – TANINO ELÁGICO (VESCALAGINA E CASTALAGINA).....	38
FIGURA 8 – ESTRUTURA FUNDAMENTAL DOS PRINCIPAIS FLAVAN-3-OIS .	38
FIGURA 9 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO APARELHO DE CLEVENGER	48
FIGURA 10 – MOLÉCULA DE DPPH, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON (ESTABILIZAÇÃO)	56
FIGURA 11 – MOLÉCULA DE DPPH ESTABILIZADA EM DIFERENTES ETAPAS	56
FIGURA 12 – PADRONIZAÇÃO DAS MICROPLACAS ESTÉREIS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS, CAULE, CASCAS DO CAULE DE <i>E. elata</i> E ORGANIZAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS, NEGATIVOS E CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO, FRENTE AOS DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE ESTA ANÁLISE.....	65
FIGURA 13 – PADRONIZAÇÃO DA MICROPLACA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> , E ORGANIZAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS, NEGATIVOS E CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO, FRENTE AOS DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE ESTA ANÁLISE.	66
FIGURA 14 – MODELO DISPOSIÇÃO NA PLACA DE ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO PARA O TESTE DE HEMÓLISE	68
FIGURA 15 – ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> , EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE HIDRODESTILAÇÃO	72
FIGURA 16 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS CONDIÇÕES REACIONAIS DO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	82

FIGURA 17 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE DPPH E FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS, APÓS O TEMPO REACIONAL.	97
FIGURA 18– PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> FRENTE À BACTÉRIA <i>Enterobacter aerogenes</i>	105
FIGURA 19– PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DOS PADRÕES-REFERÊNCIA FRENTE À LEVEDURA <i>Candida glabrata</i>	111
FIGURA 20– PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> FRENTE À BACTÉRIA <i>Candida albicans</i>	112
FIGURA 21 – MICROPLACA COM OS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS E CONTROLES FRENTE À BACTÉRIA <i>Proteus mirabilis</i>	115
FIGURA 22– PLACA DE ÁGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>E. elata</i>	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DO TESTE PRELIMINAR	69
TABELA 2 – TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS PRESENTES NAS FOLHAS SECAS DE <i>E. elata</i>	71
TABELA 3 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>E. elata</i> POR HIDRODESTILAÇÃO	72
TABELA 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, E OS VALORES PRECONIZADOS PELA ISO 3095-1974	74
TABELA 5 – SOLUBILIDADE EM ETANOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE <i>E. elata</i>	75
TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS, CASCAS DO CAULE E CAULE DE <i>E. elata</i>	76
TABELA 7 – PESQUISA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE <i>E. elata</i>	78
TABELA 8 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DOS EXTRATOS QUOSOS DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE DE <i>E. elata</i>	79
TABELA 9 – PESQUISA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE DE <i>E. elata</i>	80
TABELA 10 – RENDIMENTO EM % (M/M MV) DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS SECAS, CAULE E DAS CASCAS DO CAULE DE <i>E. elata</i>	81
TABELA 11 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E DOS PADRÕES-REFERÊNCIA	84
TABELA 12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS AMOSTRAS E PADRÕES PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	85
TABELA 13 – PORCENTAGEM DE DPPH REMANESCENTE EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E PADRÕES DE REFERÊNCIA	89

TABELA 14 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E CONTROLES POSITIVOS PELO MÉTODO DO DPPH.....	96
TABELA 15 – VALORES DAS CE ₅₀ DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA PELO ENSAIO DO DPPH.....	99
TABELA 16 – VALORES DE HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E PELO CONTROLE NEGATIVO.....	104
TABELA 17 – VALORES DE HALOS DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PADRÕES.....	106
TABELA 18 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS ANTIBIÓTICOS PADRÕES POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO/ CAVIDADE E O CRESCIMENTO BACTERIANO	108
TABELA 19 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E CONTROLE NEGATIVO.....	110
TABELA 20 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLES POSITIVOS	112
TABELA 21 – CIM (µg/ml) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> , FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS.....	118
TABELA 22 – CIM (µg/ml) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. elata</i> , FRENTE ÀS LEVEDURAS	120
TABELA 23 – MÉDIA DOS VALORES OBTIDOS PARA TESTE PRELIMINAR DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL <i>E. elata</i>	122

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO	83
GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E PADRÕES EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	86
GRÁFICO 3 – CURVA ANALÍTICA DO DPPH.....	88
GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	90
GRÁFICO 5 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH ..	91
GRÁFICO 6 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO - BUTANOL DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	91
GRÁFICO 7 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	91
GRÁFICO 8 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH	92
GRÁFICO 9 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH ..	92
GRÁFICO 10 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH.....	92
GRÁFICO 11 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH.....	923
GRÁFICO 12 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH.....	93
GRÁFICO 13 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH	93
GRÁFICO 14 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH	934
GRÁFICO 15 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DO DPPH	94
GRÁFICO 16 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE RUTINA, PELO MÉTODO DO DPPH.....	94

GRÁFICO 17 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO
METANÓLICA DE ÁCIDO GÁLICO, PELO MÉTODO DO DPPH ...95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
% AA	porcentagem de atividade antioxidante
µg	micrograma
µL	microlitros
µm	micrômetro
Abs	absorvância
ATCC	american type culture collection
CE ₅₀	concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH
CIM	concentração inibitória mínima
Cm	centímetros
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH	radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DPPH _{REM}	DPPH remanescente
EAG	equivalentes de ácido gálico
EB	extrato bruto
<i>et al.</i>	expressão latina abreviada de <i>et alli</i> , (= e outros)
FAE	fração acetato de etila
FeCl ₃	cloreto férrico
G	grama
Kg	quilograma
L	Litro
M	metro
M	molar
m/m	massa por massa
m/v	massa por volume
MG	miligrama
Min	minuto
mL	mililitro
Mm	milímetro
Mmol	milimol
N	normal
Nm	nanômetros
p/p	peso por peso
p/v	peso por volume
PPM	partes por milhão
pH	potencial hidrogeniônico
REUNI	Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
RPM	rotações por minuto
SM	solução mãe
sp.	relativo a espécie do gênero
TTC	cloreto de trifenil tetrazólio
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume
v/m	volume por massa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	24
3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE	25
3.3 GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	25
3.3.1 <i>Eucalyptus elata</i>	28
3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS DO GÊNERO <i>EUCALYPTUS</i>	29
3.4.1 Óleos essenciais	29
3.4.1.1 Óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sp	30
3.4.2 Compostos fenólicos	32
3.4.3 Flavonóides	33
3.4.4 Taninos	36
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	39
3.5.1 Atividade antioxidante	39
3.5.2 Atividade antimicrobiana	40
3.5.3 Atividade hemolítica	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	46
4.1.1 Coleta e Identificação botânica	46
4.1.2 Secagem do material botânico	46
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS	47
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	48
4.3.1 Determinação do rendimento do óleo essencial	49
4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS	49
4.4.1 Densidade relativa	49
4.4.2 Índice de refração	50
4.4.3 Solubilidade em etanol	50
4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	50

4.5.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v).....	50
4.5.2 Fracionamento do extrato hidroalcoólico.....	51
4.5.3 Análise fitoquímica dos metabólitos secundários	52
4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO	53
4.6.1 Preparo dos extratos aquosos.....	53
4.6.2 Caracterização dos metabólitos secundários	53
4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	54
4.7.1 Atividade antioxidante	54
4.7.1.1 Método do fosfomolibdênio	54
4.7.1.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	55
4.7.2 Atividade antimicrobiana	59
4.7.2.1 Microorganismos	59
4.7.2.2 Meio de Cultura	59
4.7.2.3 Preparo do inóculo	60
4.7.2.4 Difusão em meio sólido a partir de orifício.....	60
4.7.2.5 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	62
4.7.2.6 Investigação preliminar para a determinação da concentração bacteriostática/ bactericida mínima (CBM) e concentração fungistática/ fungicida mínima (CFM)	66
4.7.3 Atividade Hemolítica.....	67
4.7.3.1 Determinação da atividade hemolítica em placas contendo ágar sangue de carneiro.....	67
4.7.3.2 Determinação da atividade hemolítica em tubos de vidro contendo sangue de carneiro a 2%	68
4.7.3.3 Teste preliminar para determinação da atividade hemolítica em tubos de vidro contendo sangue de carneiro a 2%	69
4.8 Análises estatísticas	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DAS FOLHAS SECAS	71
5.2 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS.....	71
5.2.1 Rendimento do óleo essencial	71
5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS	73
5.3.1 Densidade relativa.....	74
5.3.2 Índice de refração.....	74
5.3.3 Solubilidade em etanol	75
5.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS	76

5.4.1 Características organolépticas	76
5.4.2 Compostos bioativos	76
5.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	78
5.5.1 Características Organolépticas	78
5.5.2 Compostos bioativos	79
5.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	80
5.6.1 Rendimento das frações.....	81
5.6.2 Atividade antioxidante	82
5.6.2.1 Método do fosfomolibdênio	82
5.6.2.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	87
5.6.3 Atividade antimicrobiana	101
5.6.3.1 Teste de difusão em meio sólido a partir de cavidades.....	102
5.6.3.2 Teste da microdiluição em caldo	114
5.6.4 Atividade Hemolítica.....	121
5.6.4.1 Determinação da atividade hemolítica em placas de ágar sangue de carneiro.....	121
5.6.4.2 Determinação da atividade hemolítica em tubos sangue de carneiro a 2%	122
5.6.4.3 Teste preliminar para determinação da atividade hemolítica em tubos sangue de carneiro a 2%.....	123
6 CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS.....	126

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias na área farmacêutica tem na diversidade vegetal um potencial enorme para gerar riquezas e produtos inovadores. O Brasil é um dos maiores bancos genéticos do planeta, com imensa riqueza vegetal disponível, porém com uma posição tímida quase paradoxal em relação à exploração destes recursos.

No caso da produção de fitoterápicos a situação solicita, tanto do ponto de vista técnico quanto estratégico, uma solução para que possamos obter a partir deste manancial vegetal medicamentos eficazes, seguros e de qualidade.

O uso de plantas medicinais para a cura dos seres humanos é provavelmente concomitante com a história do próprio homem. No mundo atual este conhecimento é acumulado através dos séculos, das culturas e tradições humanas passando a constituir uma das maneiras mais imediatas e seguras de acessar as propriedades das plantas medicinais.

Existem duas subdivisões na medicina, a tradicional que está intimamente correlacionada com a religião e medicina indígena autêntica, onde as tribos indígenas acreditavam em seus rituais espirituais, como o auxílio na cura da enfermidade sem interferência das outras culturas e principalmente a ocidental. Desta forma, a informação tradicional se enquadra como um bem que deve ser extremamente valorizado, pois dentre muitas de suas funções auxilia a produção de derivados da biodiversidade com um custo muito menor, já que economiza inúmeras etapas no processo de bioprospecção.

Num país como o Brasil, com uma flora tão diversificada, com uma riqueza tão grande de plantas medicinais, a busca pelo conhecimento do uso popular, a chamada etnofarmacologia, tem uma garantia de sucesso extremamente superior do que a busca de atividade nas plantas de forma aleatória.

Países em desenvolvimento e ricos em biodiversidade como os países da América Latina, onde a área a ser explorada ainda é bastante extensa, sofrem com a biopirataria, pois ainda não há legislação nacional e internacionalmente aceita que regule a saída e uso de material vegetal do país, e isso pode ser relatado pelo dado de que apesar da América Latina ter a maior biodiversidade, o maior número de patentes está no Japão.

O Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta, isso inclui as plantas medicinais, que são matérias primas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos, sendo assim o apoio a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação, com base na biodiversidade brasileira de acordo com as necessidades epidemiológicas da população, constitui importante estratégia para a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. O programa nacional possibilitará o desenvolvimento da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, a fim de garantir a eficácia, a segurança e a qualidade destes produtos.

No ano de 2009 o Brasil encontrava-se entre os quatro principais países responsáveis pela produção de óleo essencial, estando ao lado da Índia, China e da Indonésia. Esta produção de óleo essencial iniciou-se próximo do ano de 1920, onde tínhamos o extrativismo de essências naturais, porém foi durante a Segunda Guerra Mundial que o país se organizou na atividade, incluindo o cultivo do eucalipto como uma das espécies selecionadas pelas várias atividades farmacológicas desta (ÓLEOS, 2003).

O presente trabalho pretende contribuir com novas informações da espécie de eucalipto ainda não muito explorada pela comunidade científica, diminuindo assim a escassez de estudos fitoquímicos e biológicos de *Eucalyptus elata*, buscando características que agreguem valor comercial à espécie, como o uso de seus constituintes na terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar ensaios fitoquímicos e determinar bioatividade de substâncias presentes nas folhas, caule, cascas do caule e do óleo essencial de *Eucalyptus elata*, Myrtaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o preparo do material botânico para análise;
- Preparar exsicata da espécie para a identificação e posterior tombamento da espécie, no Herbário do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná;
- Determinação do teor de umidade das folhas;
- Extração do óleo essencial das folhas frescas e secas de *E. elata*, por hidrodestilação e determinar o seu rendimento;
- Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial das folhas secas;
- Preparar o extrato hidroalcoólico a 20% e aquoso a 20% das folhas, caule e cascas do caule;
- Obter frações dos extratos de folhas secas, caule e cascas do caule;
- Realizar os ensaios fitoquímicos para determinar a presença de diferentes grupos bioativos presentes nos extratos de folhas secas, caule e cascas do caule;
- Analisar através de testes “*in vitro*” a atividade antioxidante das frações e do extrato bruto de folhas secas, caule e cascas do caule;
- Analisar através de testes “*in vitro*” a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas secas e dos extratos hidroalcoólicos de folhas secas, caule e cascas do caule frente a micro-organismos padrão;
- Analisar através de testes “*in vitro*” a atividade hemolítica do óleo essencial de folhas secas, dos extratos brutos de folhas, caule e cascas do caule e suas respectivas frações;

- Comparar os bioativos pesquisados desta espécie, com os demais ativos encontrados na literatura referente a família Myrtaceae;
- Relacionar o seu uso e as vantagens para a sociedade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

A fitoterapia é uma prática terapêutica milenar, presente em todas as sociedades humanas. Ao longo de séculos, vem sendo utilizada e documentada por seu valioso conhecimento tradicional e popular decorrente de sua rica diversidade étnica e cultural. Esses conhecimentos são fontes estratégicas de informações preliminares de eficácia ou toxicidade das plantas medicinais, inspirando muitos estudos científicos sobre essas propriedades terapêuticas. A tradição de uso contribui enormemente com o surgimento de medicamentos inovadores, hoje comercializados em todo o mundo, para o tratamento de inúmeras enfermidades, inclusive para o câncer.

A biodiversidade brasileira está aliada a uma diversidade de povos e comunidades com visões, saberes e culturas próprias, por isso é imprescindível promover o resgate, o reconhecimento e a valorização das práticas tradicionais e populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros como elementos para a promoção da saúde, conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998). O Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta, isso inclui plantas medicinais que são matérias primas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos.

O apoio do governo nacional à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira de acordo com as necessidades epidemiológicas da população constitui importante estratégia para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e desta forma o acesso a informação e aos benefícios trazidos pela produção nacional de medicamentos a base de plantas medicinais.

3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família botânica Myrtaceae está inserida na ordem Myrtales (Myrtaceae), com compreende 150 gêneros e cerca de 3.600 espécies. São plantas arbustivas ou arbóreas, sendo que os vegetais desta família apresentam nas suas partes aéreas unidades unicelulares ou pluricelulares que guardam óleos essenciais em abundância (CRONQUIST, 1981). É representado disperso em duas áreas, sendo as Américas, especialmente a área de clima tropical e na região sul da Austrália onde, pode-se observar o clima mais quente e temperado (JOLY, 1985). Os maiores gêneros de Myrtaceae são o gênero *Eugenia*, onde se encontram a pitanga e o jambo e possui cerca de 600 espécies, o gênero *Eucalyptus*, com cerca de 500 espécies, o gênero *Myrcia* com cerca de 300 espécies, o gênero *Syzygium*, com cerca de 200 espécies, o gênero *Psidium* representada pela goiaba e o gênero *Melaleuca* com cerca de 100 espécies (CRONQUIST, 1981).

Atualmente o gênero *Eucalyptus* é cultivado em larga escala nas regiões tropicais, principalmente África e Brasil para obtenção de matéria-prima como: madeira serrada, celulose para a fabricação de papel e carvão vegetal para fins energéticos (CRUZ; KAPLAN, 2004). As espécies de Myrtaceae são lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras de disposição alternada ou oposta, suas flores geralmente são brancas ou vermelhas (JOLY, 1966).

Estão presentes na família desde pequenos arbustos com cerca de 2 metros de altura até algumas espécies de *Eucalyptus* nativos de florestas australianas com cerca de 100 metros de altura, sendo este o gênero de maior representatividade da família Myrtaceae (CRONQUIST, 1981). As Myrtaceae brasileiras florescem de forma geral no início da primavera e possuem um caule de casca lisa que se renova como cada estação de crescimento (JOLY, 1966).

3.3 GÊNERO *Eucalyptus*

A primeira descrição botânica do gênero *Eucalyptus* spp. foi da autoria de Charles Louis L'Héritier de Brutelle, em 1788, onde faz referência ao formato globular arredondado dos frutos destas árvores, os quais apresentam o opérculo cobrindo suas sementes até que estas estejam completamente desenvolvidas,

podendo ser traduzido do grego como “boa cobertura”, onde o primeiro deriva de duas palavras gregas, *eu* (bem) e *kalypto* (cobrir) (FABROWSKI, 2002). Este opérculo é formado por pétalas modificadas, no entanto o poder de atração de sua flor deve-se à exuberância de seus estames, e não às pétalas. Os frutos são lenhosos, ligeiramente cônicos, e possuem válvulas que se abrem para dispersar as sementes, desta forma as flores e os frutos podem ser considerados os elementos mais característicos das espécies de *Eucalyptus*.

Atualmente, o *Eucalyptus spp.* tem as seguintes denominações taxionômicas:

Classificação Científica

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Myrtales*

Família: *Myrtaceae*

Gênero: *Eucalyptus*

Existem algumas particularidades existentes nas folhas de *Eucalyptus spp.*, em quase sua totalidade possuem folhagem persistente e muitas espécies apresentam dimorfismo foliar. Quando jovens suas folhas são opostas, de ovais a arredondadas e, ocasionalmente, sem pecíolo, e após um ou dois anos de crescimento, a maioria das espécies passa a apresentar folhas alternadas, de lanceoladas a falciformes e estreitas. Contudo, existem várias espécies, como a *Eucalyptus melanophloia* e a *Eucalyptus setosa* que mantêm a forma juvenil ao longo de sua vida. A maior parte das espécies não floresce enquanto a folhagem adulta não aparece, sendo a *Eucalyptus cinerea* e a *Eucalyptus perriniana* as raras exceções.

O gênero *Eucalyptus* é oriundo da Austrália, como mostra a FIGURA 1, porém aproximadamente em 1804 iniciou-se a migração mundial do gênero *Eucalyptus*, chegando à França as primeiras sementes de *Eucalyptus globulus* Labill. Logo o gênero foi se espalhando por outros países da Europa, África, Ásia, América do Norte e Sul, chegando enfim ao Brasil entre 1855 e 1870 como plantas ornamentais, e medicinais, e com o objetivo de oferecer proteção do vento (PENFOLD, 1961). Adaptados a praticamente todas as condições climáticas, os eucaliptos caracterizam

a paisagem da Oceania de uma forma que não é comparável a qualquer outra espécie, noutro continente.

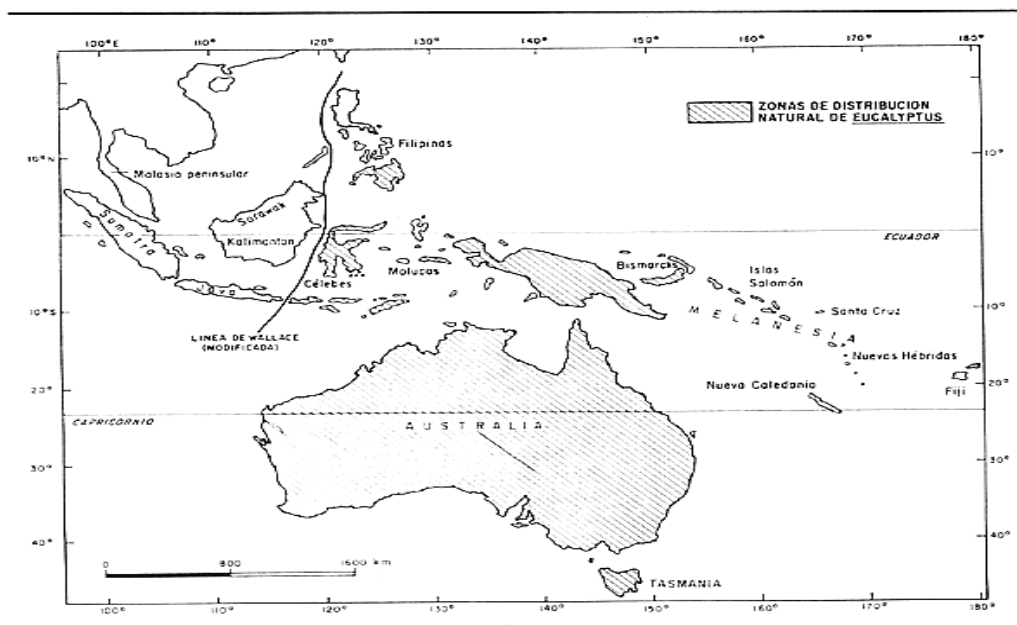


FIGURA 1 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO NATURAL DE *Eucalyptus*

Fonte: JACOBS, 1955

Como as espécies deste gênero são capazes de gerar grande quantidade de biomassa em pouco tempo, nas primeiras décadas do século XX o Brasil já oferecia uma escala comercial de espécies do gênero por consequência do florestamento e do reflorestamento, sendo cultivadas com o intuito de suprir as necessidades de combustível para as locomotivas e de madeiras para dormentes durante a produção de trilhos. São Paulo foi a cidade onde se concentrava a maior quantidade de área plantada de eucalipto, chegando a cerca de 80 % da área plantada no país dentre os anos de 1904 e 1966 (SHIVA; PADHYAY, 1991).

Devido à expansão das indústrias siderúrgicas (combustível), construção (madeira), as de papel e celulose, produção de couro (pela alta quantidade de taninos extraíveis utilizados na curtição do couro), óleos essenciais na indústria farmacêutica, em meados dos anos 60 o Brasil possuía a maior área de *Eucalyptus* no mundo, chegando próximo a três milhões de hectares (ELDRIGE, 1994).

A expressão “florestas azuis da Austrália” se refere a formação de uma névoa de coloração azulada ao redor das árvores de eucalipto que ocorre pela evaporação de seus óleos essenciais pelo aumento da temperatura, sendo que este óleo possui

atividade antisséptica capaz de proteger a árvore do ataque de pestes e pragas (ROCHA; SANTOS, 2007).

Nos locais com maior concentração de eucaliptos e nos dias de calor mais intensos, ocorrem muitos incêndios florestais suspeitos de serem originados por queimadas ou atos criminosos, porém estes podem ser de fato, resultados da autocombustão dos óleos voláteis, que pelo calor excessivo são liberados em altíssimas concentrações, visto que as folhas de eucalipto estão cobertas de glândulas que segregam óleo, sendo este gênero botânico perdulário na sua produção. Desta forma os eucaliptos são as espécies que mais iniciam e propagam incêndios florestais, em contrapartida, fazem parte das espécies que mais resistem a estes, pois conseguem absorver grandes quantidades de água, apresentando assim vantagem competitiva sobre as demais espécies vegetais (SANTOS, 1997).

3.3.1 *Eucalyptus elata*

Eucalyptus elata, corresponde a uma árvore de porte médio a alto, podendo chegar até 40 metros de altura, com a casca áspera na parte inferior do caule, com a coloração cinza escuro e mais lisa e compactada na parte superior, onde se encontra esbranquiçada e com estreitas fissuras longitudinais, por possuir uma madeira de boa qualidade por ser utilizada na fabricação de pasta para celulose, papel e carvão vegetal (MARGULES, 1988).

Folhas adultas são verde escuro, lanceoladas, alternas e com cerca de 12 x 2,8 cm, seu fruto é seco, capsular, possui também flores brancas que aparecem na época da primavera para o verão. Sua distribuição ocorre nos planaltos centrais e faixas costeiras do Sul de Nova Gales do Sul e áreas adjacentes, em Vitória (MARGULES, 1988).

A espécie de *E. elata* é amplamente cultivada como árvore ornamental pela sua bela casca lisa superior, rica folhagem verde e profusão de flores que aparecem em buques esféricos. As folhas são comercialmente utilizadas para obtenção de seu óleo essencial.

3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS DO GÊNERO *EUCALYPTUS*

3.4.1 Óleos essenciais

Sabe-se que a utilização de óleos essenciais data de séculos antes da era Cristã e estão historicamente mais ligados a alguns países como o Egito, a Pérsia, o Japão, a China e a Índia, porém foi apenas em meados do século XVIII que se iniciaram os estudos de uma grande variedade de plantas conhecidas nos dias atuais, estes estudos mostraram as suas propriedades químicas e utilização destes óleos, e desta forma houve um grande estímulo a produção de óleos essenciais pelas indústrias farmacêuticas (VITTI, 2003).

Os óleos essenciais compreendem uma mistura de substâncias voláteis extraídas de plantas e que podem ser matérias-primas importantes para as indústrias cosméticas e farmacêuticas. Podem ser denominados óleos etéreos, por serem solúveis em solventes apolares como o éter, ou essências, sendo estes uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente intensamente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente (MICHELIN, 2005).

Apesar dos óleos essenciais serem uma mistura bastante complexa de compostos de determinadas plantas, muitos destes compostos são de alguma forma obtidos sinteticamente por dificuldade de obtenção das plantas que os sintetizam e principalmente pelo baixo rendimento durante o seu processo de extração, contudo a composição dos aromas sintéticos apenas se aproxima dos óleos essenciais naturais sem mimetizá-los completamente (SIMÕES, 2010).

Apresentam também, características que facilitam sua identificação como sabor geralmente acre, assim que extraídos apresentam coloração levemente amarelada ou incolores, com exceção do óleo da camomila que apresenta coloração azul, apresentam baixa estabilidade, principalmente quando frente a calor, luz, umidade, ar e metais e na sua maioria são oticamente ativos exibindo índices de refração específicos.

Possuem definição internacional determinada pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste de vapor d'água (SIMÕES *et al.*, 2010).

São produzidos por cerca de 2.000 espécies de plantas, distribuídas em cerca de 60 famílias, ocorrem em estruturas especializadas das plantas como nos pêlos

capilares, células parenquimáticas diferenciadas, tubos oleaginosos e canais secretores presentes nas flores, folhas, caules, folhas e frutos.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em busca de um sistema adaptativo diferencial, ou seja, nas flores e frutos têm função de atrair os insetos paralelamente aos pigmentos para estimular a polinização e em contrapartida na casca têm função protetora, atuando como repelente ou inseticida, como é o caso da citronela, ainda nas folhas têm função reguladora da taxa de respiração através da diminuição da difusão no parênquima foliar e noturna como condicionadores de temperatura.

Na sua constituição estão presentes grupamentos químicos como hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, compostos com enxofre (DORAN, 1991). Na mistura complexa dos óleos essenciais estes grupamentos estão em diferentes concentrações, sendo que um deles será sempre o composto majoritário, havendo ainda outros em menores concentrações e alguns em baixíssimas concentrações denominados de traços.

3.4.1.1 Óleos essenciais de *Eucalyptus* sp

A produção de óleo essencial no Brasil iniciou-se com o extrativismo do pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) em 1927 no qual a produção aproximou-se a 200 toneladas, porém o verdadeiro início desta prática ocorreu somente durante a Segunda Guerra Mundial que gerou uma grande desorganização do transporte e do comércio, dando início a extração dos óleos vegetais de canela (*Cinnamomum* sp), eucalipto (*Eucalyptus* sp), laranja (*Citrus* sp), menta (*Mentha* sp), patchouli (*Pogostemon* sp) e outros para serem utilizados como fontes de suprimento, destinados principalmente para o mercado externo (BRAGA, 1971). Após a guerra com o restabelecimento das relações internacionais e conseqüentemente a reativação do mercado internacional houve uma acentuada queda nos níveis importação e o Brasil perder a posição extraordinária que havia estabelecido e desta forma a produção nacional entrou em crise, porém neste mesmo período a produção brasileira se industrializou possibilitando o aumento do mercado interno de óleos essenciais. Anos mais tarde, na década de 50, houve novamente um estímulo do

consumo interno no Brasil, pois empresas internacionais do ramo de fragrâncias e aromas para a produção de perfumes, cosméticos, produtos alimentícios, farmacêuticos e de higiene se instalaram no país.

Com a implantação do sistema de incentivos fiscais à exportação em 1967, o mercado externo volta a se expandir, conforme demonstrado por Ciniglio (1993) que mostra que nos anos de 1964, 1966, 1968 a produção dos óleos de eucalipto era estimada em 79, 80 e 141 toneladas, ocorrendo principalmente no estado de São Paulo e Mato Grosso.

Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário das plantas e no caso dos *Eucalyptus* a sua produção se deve ao sistema adaptativo de resistência contra insetos, resistência ao frio quando no estágio de plântulas, ao efeito alelopático e a redução da perda de água, sendo que estes itens ainda precisam de mais estudos comprobatórios (DORAN, 1991).

De acordo com Penfold e Willis (1961), Lassak (1988) e Doran (1991) os óleos essenciais de eucalipto pode ser dividido em três grupos, que irão caracterizar a sua utilização, sendo estes os óleos medicinais, os quais apresentam o cineol como componente principal, na concentração mínima de 70%, sendo assim destinada a produção de medicamentos, como inalantes, estimulantes de secreção nasal e produtos de higiene bucal, como flavorizante de medicamentos, sendo o maior representante deste grupo no Brasil o *E. globulus*. Há também os óleos industriais, que não são explorados de forma tão avassaladora no Brasil, e os que possuem felandreno como componente majoritário em sua composição é usado como matéria prima e solvente, na produção de desinfetantes e desodorizantes. E o outro grupo dos óleos utilizados na perfumaria, os quais apresentam como seu principal representante o *E. citriodora*, o qual possui o citronelal como componente majoritário, fazendo parte da composição de perfumes para os mais diversos fins como a produção de produtos de limpeza, como detergentes, sabões e desinfetantes.

Depois de algum tempo o Brasil começou a receber uma notação mundialmente negativa, pois a mão de obra representava, além dos encargos sociais, aproximadamente 50 a 60% do custo total de produção, gerando um grande estímulo às importações de óleos essenciais, pois os principais países produtores de óleo eram os países da Ásia, África e América Central, onde a mão de obra era

extremamente barata, tornando os óleos essenciais nacionais mais caros do que os fornecidos pelo mercado externo (VITTI, 2003).

Segundo Vitti e Brito (2003) existem três principais espécies de eucalipto que merecem destaque na produção de óleo essencial no Brasil são o *E. citriodora* que inicialmente foi cultivado para a extração de sua madeira de ótima qualidade para a produção de carvão vegetal, postes, madeira para serraria, mourões de cercas e lenha, porém como possui um forte odor citronelal em suas folhas, também é cultivado no país para a produção de óleo essencial, o *E. globulus*, que possui quatro subespécies produtoras de óleo essencial e o *E. staigeriana* tendo seu plantio no Brasil destinado apenas para a produção de óleo essencial e sua madeira se destina basicamente para a produção de lenha.

Alguns fatores como variabilidade genética, a qual visa o aumento do rendimento na produção do óleo e por conta disto uma maior quantidade do componente químico desejado, idade da folha, condições ambientais como a temperatura, a umidade relativa, a duração da exposição ao sol e o regime dos ventos, o tipo do manejo florestal e os materiais utilizados para a amostragem das folhas, o processo de extração e a análise do óleo influenciam diretamente na produção, rendimento e qualidade do óleo essencial de eucalipto (SIMÕES, 2010).

3.4.2 Compostos fenólicos

Encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos, fazendo também parte do metabolismo animal, entretanto no que se sabe até hoje os animais são seres incapazes de sintetizar anéis aromáticos e por conta disto estes anéis que são necessários para a síntese dos compostos fenólicos, mesmo que em pequena quantidade são obtidos exclusivamente de dieta alimentar rica em anéis benzênicos.

No reino vegetal e a maioria dos micro-organismos possuem a capacidade de produzir os compostos fenólicos a partir da síntese do anel benzênico, sendo compostos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais e possuem estruturas variadas.

Correspondem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas que possuem ao menos um anel aromático em

que há a substituição de um hidrogênio por um grupamento hidroxila. Sendo que neste grupo podemos também obter as lignanas e os taninos e as suas estruturas fenólicas podem fazer parte de proteínas, alcalóides e terpenóides.

Sendo assim a maior parte dos compostos fenólicos dificilmente será encontrada na natureza na forma livre, mas sim na forma de ésteres ou heterosídeos, solúveis em água e solventes polares. Por serem fenólicos possuem a característica de ser extremamente reativo, fato que não deve ser esquecido quando isolado dos vegetais, possuem característica ácida e desta forma podem ser isolados facilmente em meio fracamente básico.

Por serem aromáticos possuem intensa capacidade de absorção na região UV, possuem a capacidade de complexação com proteína por realizarem entre estas pontes de hidrogênio intermoleculares, sendo esta uma reação de identificação. Os fenóis podem também se complexar com metais, sendo estes importantes para o mecanismo biológico e por fim possuem facilidade de oxidação através da luz ou do calor.

Possui propriedades como o realce de sabor, odor e coloração de vegetais, sendo assim muito utilizados pelas indústrias alimentícias como corantes e flavorizantes, como é o caso da canela (*Cinnamomum verum* J. S. Presl.) e da vanila (*Vanilla planifolia*) ricas em aldeído cinâmico. Para alguns derivados de ácidos fenólicos tem sido relatada atividade antioxidante e, com isso, evidências sugerindo que doenças causadas por reações oxidativas podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais provenientes da dieta (SIMÕES *et al.*, 2010).

3.4.3 Flavonóides

Constituem uma importante classe de polifenóis, fazem parte dos metabólitos secundários das plantas e sua origem biosintética se dá por meio dos fenilpropanóides, fato importante na sua identificação, pois as substâncias fenólicas ou polifenólicas são aquelas que possuem em sua estrutura um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ ou seus derivados de função como ésteres, éteres, glicosídeos e outros, porém esta definição não é completamente adequada visto que existem outras classes de metabólitos que

podem possuir em sua estrutura hidroxilas fenólicas, diferenciando-se assim pela sua origem biogenética (ROBINSON, 1991).

A estrutura fundamental da maioria dos representantes do grupo apresenta em seu grupo fundamental 15 átomos de carbono, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, nos compostos tricíclicos as unidades são chamadas de núcleos A, B e C e para os núcleos A e C os átomos de carbono recebem uma numeração com números ordinários, já o anel B recebe a numeração com os mesmos números ordinários seguidos de um apóstrofo (') como mostra a FIGURA 2. Alguns autores podem também substituir a numeração 9 e 10 dos flavonóides por 8a e 4a, respectivamente (ROBINSON, 1991).

Estão amplamente distribuídos no reino vegetal entre os compostos de origem natural com grupos fenólicos mais importantes e diversificados, apresentando grande diversidade estrutural principalmente nas angiospermas. Sendo que a este grupo são atribuídas várias funções como a de proteção contra os raios ultravioleta e visível e proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais polinizadores, antioxidantes, controle de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE; WILLINAMS, 2000).

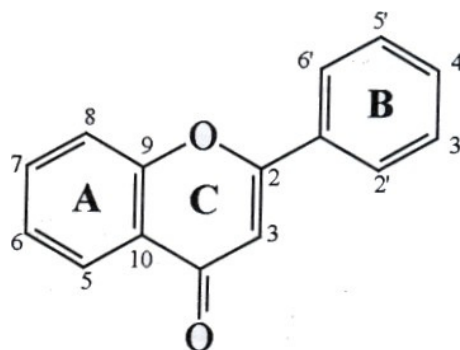


FIGURA 2 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010

Sendo amplamente encontrados nas plantas, estes foram também detectados nas folhas, cascas do caule e madeira de várias espécies de *Eucalyptus*, dentre os isolados foram encontrados a quercetina (FIGURA 3) e o canferol (FIGURA 4), com atividade antiinflamatória e com maior restrição nas espécies a rutina (FIGURA 5), com incontestável atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

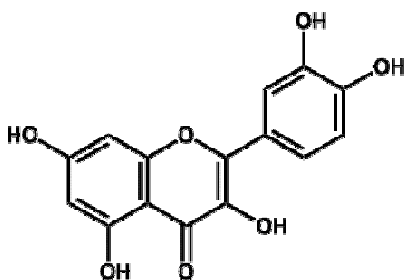


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010

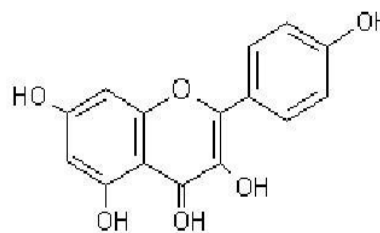


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010

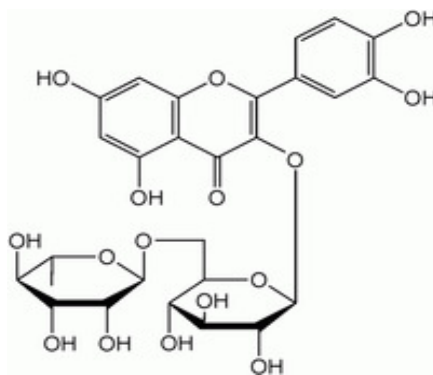


FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010

Os flavonóides de origem natural encontram-se geralmente oxigenados e conjugados a grupamentos de açúcares, chamados assim de heterosídeos, sendo que o número de estruturas existentes quase dobrou nos últimos vinte anos, existindo assim mais de 4.200 flavonóides diferentes. Quando a ligação com açúcares ocorre por intermédio de uma hidroxila o flavonóide é denominado O-heterosídeo e se a ligação ocorrer por intermédio de um átomo de carbono ele será denominado C-heterosídeo. Quando os flavonóides encontram-se sem o açúcar são denominados aglicona ou genina.

Pela sua grande diversidade os flavonóides encontrados nas flores, podem ser diferentes dos encontrados nas demais partes das plantas como folhas, caules raízes e frutos, podendo também estar em diferentes concentrações nos órgãos destas (SOUSA *et al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos por diversos grupos, muitas vezes com origens biossintéticas muito próximas, sendo os principais representantes os flavonóis, as flavonas, as chalconas, di-hidrochalconas, auronas, flavanonas, flavanas, catequinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, isoflavonas, biflavonóides e neoflavonóides (SIMÕES *et al.*, 2010).

A maioria dos flavonóides possui cor, podendo assim ser utilizados com pigmentos, mas também são usados no processo de fermentação do chá da Índia, manufatura do cacau, possui também propriedades farmacológicas como: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante e antiviral, desta forma existe um grande interesse econômico quando se fala de flavonóides.

A capacidade antioxidante presente nos flavonóides ocorre pelas suas características estruturais, ou seja, pela presença de três anéis aromáticos com radicais oxigenados a eles ligados, possuindo um aumento desta atividade farmacológica quando no anel C, grupos hidroxil ligados na posição carbônica 3 e as duplas ligações entre os carbonos 2 e 3, se unem ao número de radicais hidroxil ligados ao anel A e B (VIEIRA *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

3.4.4 Taninos

São compostos de origem natural e que são conhecidos pela sua capacidade de complexar proteínas formando agregados em solução. Possuem também a habilidade de transformar a pele de animais em couro (processo de curtimento), durante este processo são formadas ligações entre as fibras de colágeno na pele do animal, a qual adquire resistência ao calor, água e abrasivos, explicando a capacidade de precipitar celulose, pectinas e proteínas.

A definição fitoquímica de taninos foi descrita pela primeira vez no ano de 1962 sendo como “Correspondem a substâncias fenólicas solúveis em água com massa entre 500 e 3.000 Daltons, as quais apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas” (BATE, 1962; CARVALHO, 2007).

São importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, estando presentes nos alimentos do cotidiano, como no vinho seco. A complexação entre taninos é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias. Os taninos de forma geral possuem também atividade antioxidante e, por conta disto seqüestram radicais livres, evitando processos oxidativos de óleos e gorduras e amenizam o envelhecimento cutâneo, já foram também relatadas atividades antidiarréica,

protetores de feridas externas, antibacteriana, antifúngica, entre outras (COSTA, 2002; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2010).

São classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis, que são os mais encontrados, e os taninos condensados ou não hidrolisáveis.

Os taninos hidrolisáveis recebem este nome, pois sofrem hidrólise ácida ou enzimática e dentro do grupo dos taninos hidrolisáveis tem-se uma subclassificação e que depende do produto da hidrólise, sendo estes os taninos gálicos, que correspondem à hidrólise de um tanino formando várias moléculas do ácido gálico, e que não apresentam propriedades tanantes e os taninos elágicos que possuem uma ligação C – C difícil de romper. Apesar de possuírem estruturas distintas, ambas precisam se unir a outras unidades iguais para apresentarem propriedades tanantes, sendo assim unidas por ligações do tipo éster que são facilmente hidrolisáveis, conforme mostram exemplos na FIGURA 6 e 7 (CARVALHO, 2007; SIMÕES, 2010).

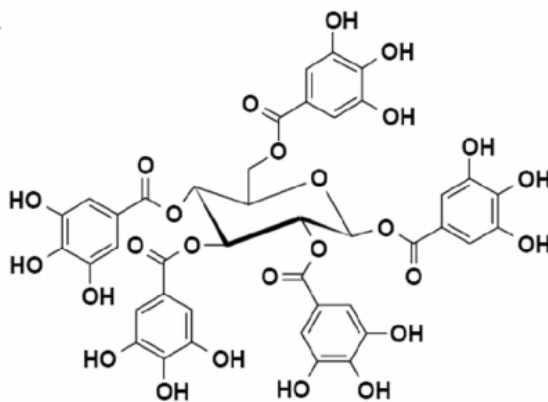


FIGURA 6 - TANINO GÁLICO (β -1,2,3,4,6 –PENTAGALOI-D-GLICOSE)
Fonte: CARVALHO, 2007

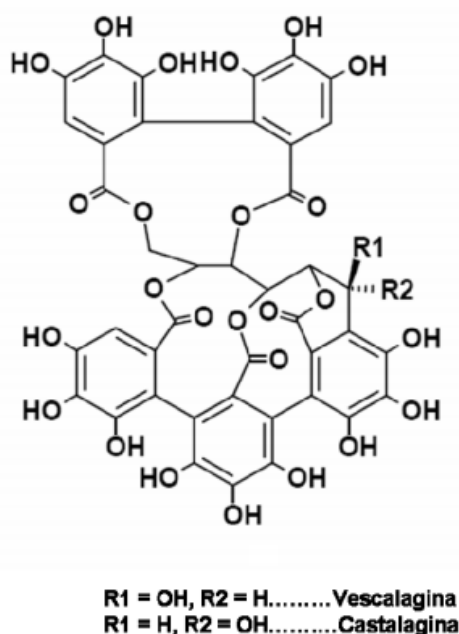


FIGURA 7 - TANINO ELÁGICO (VESCALAGINA E CASTALAGINA)

Fonte: CARVALHO, 2007

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros constituídos por duas ou mais unidades condensadas de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (FIGURA 8). Quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas, gerando uma reação de coloração avermelhada, sendo também conhecidos por proantocianidinas.

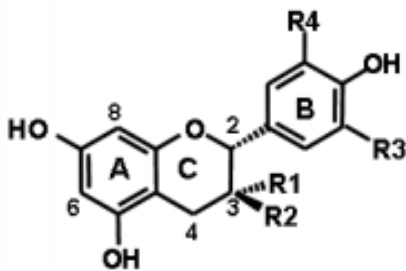


FIGURA 8 - ESTRUTURA FUNDAMENTAL DOS PRINCIPAIS FLAVAN-3-OIS

Fonte: CARVALHO, 2007

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.5.1 Atividade antioxidante

Os agentes oxidantes, chamados de radicais livres, são moléculas extremamente instáveis que possuem um elétron desemparelhado em sua órbita externa, gravitando em sentido oposto aos demais elétrons. São moléculas altamente reativas que para se estabilizar seqüestram elétrons de estruturas muito frágeis, ou seja, estruturas que doam seus elétrons com muita facilidade como os componentes celulares (RUFINO *et al.*, 2007; VANZIN; PIRES, 2011).

Os radicais livres tem uma vida média de milésimos de segundo, mas eventualmente podem se tornar estáveis, produzindo reações biológicas lesivas. Estes elementos são gerados desde o momento da concepção e sua produção é contínua durante nossa existência, sendo produzidos durante o processo natural de respiração celular e produção de energia dentro das mitocôndrias, porém também são produzidos por estímulos extrínsecos como: poluição, raios X, radiação UV, tabagismo, álcool, resíduos de pesticidas, aditivos químicos dos alimentos, hormônios, estresse, alimentação inadequada, falta de exercícios físicos (RUFINO *et al.*, 2007; VANZIN; PIRES, 2011).

Os agentes oxidativos agem em diferentes níveis celulares, sendo responsáveis por desencadear nestas o chamado processo oxidativo. As mitocôndrias são os alvos preferenciais das reações radiculares e ao longo do processo, observa-se a energia da célula esgotar e as reações de reparação e renovação ficam cada vez menos acessíveis (VANZIN; PIRES, 2011). Estes danos podem levar ao aparecimento de doenças e danos profundos aos tecidos, pela formação de peróxidos que atacam consecutivamente as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol, por sua vez estes peróxidos alteram a fluidez e a elasticidade da membrana celular podendo inclusive gerar a lise desta (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006, VASQUÉZ *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo ocorre quando o sistema de defesa antioxidante das células é insuficiente e pode ser corrigido parcial ou totalmente por substâncias ativas específicas utilizadas em produtos cosméticos que ajudam a eliminar as

conseqüências dos danos causados ou impedem que o sistema chegue ao nível de estresse.

Os antioxidantes são compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo das reações oxidativas, diminuindo assim a velocidade destas. As vitaminas C, E, o aminoácido cisteína, o ácido úrico, o β -caroteno são chamados de antioxidantes não enzimáticos e protegem fisiologicamente as células, existem também enzimas que fornecem esta proteção, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase/ redutase. Estes antioxidantes são produzidos naturalmente pelo nosso organismo, porém a taxa de produção é inversamente proporcional a idade, necessitando de consumo exógeno de antioxidantes (RUFINO *et al.*, 2007; MALINOWSKI, 2010).

Podendo ser encontrados na natureza em grupos de metabólitos como nos compostos fenólicos, flavonóides e taninos, porém é nos óleos essenciais que são relatadas as maiores atividades antioxidantes, principalmente nos que são ricos em compostos fenólicos como o carvacrol, eugenol e timol, pela presença de um grupamento doador de elétrons na posição *orto* em relação a hidroxila fenólica (BOSCARDIN, 2009; GUIMARÕES; SOUZA; FERREIRA, 2010).

3.5.2 Atividade antimicrobiana

A falta de saneamento básico, a desnutrição e a dificuldade de acesso aos medicamentos nos países em desenvolvimento levam a uma série de doenças correlacionadas e aumenta o número de indivíduos imunocomprometidos, estimulando desta forma o uso indiscriminado de antibióticos o que evidencia através dos anos um aumento da resistência dos micro-organismos a medicamentos e assim sua disseminação de forma descontrolada (MICHELIN, 2005; JOHANN *et al.*, 2007; ANTONIO, 2011).

Óleos essenciais e os extratos de plantas por muito tempo têm servido de base para diversas aplicações com fins profiláticos ou curativos de infecções na medicina popular e tradicional, dentre as diversas formulações destaca-se a produção de antissépticos tópicos (SIMÕES *et al.*, 2010).

Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado

como guia para pesquisas farmacológicas, tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos de plantas medicinais (MICHELIN, 2005).

Atualmente muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana, como no estudo realizado por Machado *et al.* (2003) em que foram avaliados 14 extratos de plantas medicinais brasileiras, utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a micro-organismos resistentes de importância médica.

Nascimento e colaboradores (2000) avaliaram também em seu estudo a atividade antibacteriana de vários extratos de plantas e fitofármacos sobre bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos. Alguns extratos conseguem inclusive provocar interferência sobre a replicação do vírus HIV em culturas de células (KASHIWADA *et al.*, 1998).

As espécies de micro-organismos mais citadas nos estudos, por serem as principais causadoras de patologias foram:

- *Escherichia coli*: descoberta no ano de 1885, por Theodor Escherich, sendo diagnosticada como uma bactéria bacilar Gram negativa, possuindo múltiplos flagelos dispostos em volta da célula, facultativamente anaeróbica ou aeróbica e pertencente a família das Enterobacteriaceae, sendo uma das mais comuns e antigas simbioses do homem. Tem como seu habitat natural o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Ao todo a *E. coli* é causadora de cerca de 50% dos casos de intoxicação alimentar, sendo desta forma considerada patogênica, podendo também causar infecções do trato urinário, diarreia (diarreia do viajante) de acordo com o tipo de cepa. A prevenção é comer alimentos totalmente cozidos, evitar saladas, e beber apenas água mineral ou outras bebidas oferecidas em recipiente selado (BROCK *et al.*, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Proteus mirabilis*: facultativamente anaeróbica, pertencem ao grupo dos bastonetes Gram negativos e está incluso na família das Enterobacteriaceae. Em humanos *P. mirabilis* provoca cerca de 90% de todas as infecções de *Proteus*, sendo assim de grande importância do ponto de vista médico, pois pode causar doenças do trato gastrointestinal, bem como também este flagelado extremamente móvel pode causar infecções de feridas, septicemia e pneumonia, principalmente em pacientes hospitalizados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Salmonella typhimurium*: conhecida há mais de um século e pertencente à família Enterobacteriaceae, pertencente ao grupo dos bacilos Gram negativos, que na maioria das vezes são móveis pela presença de flagelos, a *Salmonella* corresponde a um gênero de bactérias, vulgarmente chamadas salmonelas. Tem, em seu nome, uma referência ao cientista Daniel Elmer Salmon que associou a doença à bactéria pela primeira vez. Dentre as espécies de maior importância para a saúde humana, destacam-se a *S. typhi*, que causa infecções sistêmicas e febre tifóide, sendo esta uma doença endêmica em muitos países em desenvolvimento e a *Salmonella typhimurium*, um dos agentes causadores das gastroenterites (BROCK *et al.*, 2000).

- *Enterobacter aerogenes*: corresponde a uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete, anaeróbica facultativa, prosperando assim em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, bem como na ausência do mesmo. Faz parte da família Enterobacteriaceae, estando relacionada com a *E. coli* e a *Salmonella*. Em relação ao seu tamanho é considerada pequena, porém nosocomial, ou seja, encontra-se muito presente em ambientes hospitalares e relata alta incidência de resistência aos antibióticos. É considerado um patógeno oportunista, pois se prevalece de pacientes imunodeprimidos, podendo provocar diferentes patologias dependendo da área em que se hospeda, sendo as mais comumente citadas a bacteremia, osteomielite, pneumonia e septicemia, podendo também estar presentes em infecções do trato gastrointestinal, respiratório, urinário e na pele (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

- *Staphylococcus aureus*: apresenta forma esférica (cocos), formando grupos com o aspecto de cachos de uvas de coloração amarelado, devido a produção de carotenóides, por isso o nome estafilococo “dourado”. Juntamente com a *E. coli* é uma das bactérias mais antigas e que vive em simbiose com o homem, fazendo parte da flora residente da pele humana, mas, porém pela presença de toxinas, quando em grandes números pode ser considerada uma das mais virulentas espécies do gênero *Staphylococcus*. É responsável por vários tipos de infecções no organismo humano, preferencialmente na pele, pois qualquer lesão gerada na mesma servirá como porta de entrada para o patógeno, sendo as infecções mais comuns o terçol, a foliculite e o furúnculo. Além da pele o *S. aureus* pode invadir o organismo através de alimentos contaminados e caso a bactéria produza toxinas quando ingerida poderá causar infecções intestinal intensa, com a presença de vômito e diarreia. Existem também os grupos de *Staphylococcus aureus* MRSA, ou

seja, um grupo de estafilococos que criou resistência ao tratamento convencional com as penicilinas, mais especificamente a metaciclina, originando o nome do grupo *Staphylococcus aureus* resistente à metaciclina (MRSA). Este advento está correlacionado com o uso irracional de antibióticos, gerando resistência microbiana aos mesmos. Esta classe de MRSA não é mais virulenta do que os *Staphylococcus aureus* não MRSA, porém seu tratamento fica dificultado pelas opções reduzidas de antibióticos e, desta forma o paciente deverá ser isolado para evitar a propagação da bactéria (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Enterococcus faecalis*: considerada uma bactéria Gram positiva, comensal que habita a cavidade oral e o trato gastrointestinal, podendo causar severas infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite bacteriana e na cavidade oral está associado a infecções endodônticas, sendo a espécie mais frequentemente detectada em canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

- *Streptococcus pyogenes*: é uma bactéria Gram positiva do grupo A, cujo apresenta morfologia de um coco e pertence ao grupo dos Streptococcus. É a principal causadora da faringite bacteriana, erisipela (patologia subcutânea ocasionada pela circulação ineficaz), glomerulonefrite aguda, febre reumática, e por fim uma febre que ocorre após o parto, por decorrência de uma infecção no útero, denominada de febre puerperal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Bacillus subtilis*: corresponde a uma bactéria Gram positiva saprófita, conhecidos como “bacilos de grama” ou “bacilos de feno”, por serem muito comuns no solo e na água, não sendo considerada patogênica, estando presentes com frequência em alimentos estragados por tolerarem condições ambientais atípicas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

- *Candida glabrata*: corresponde a uma levedura haplóide, a qual não se acreditava ser patogênica, porém com o aumento do uso de drogas imunodepressoras, e em especial pacientes portadores do vírus HIV, diagnosticou-se que a *C. glabrata* é uma levedura oportunista e de alta virulência, podendo ser o segundo ou terceiro patógeno em casos de candidíases, principalmente quando em ambientes hospitalares. Em pacientes sadios ela se mostra uma levedura completamente inofensiva. Esta levedura apresenta menor sensibilidade ao fluconazol e sua colonização tem sido comumente associada a pacientes com exposição prolongada a este fármaco. Se compararmos a mortalidade da *C. glabrata*

às outras espécies, exceto à *C. albicans* ela será considerada alta, atingindo cerca de 50% dos pacientes portadores de neoplasias malignas e 100% em pacientes com complicações no transplante de medula óssea (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Candida albicans*: é uma levedura que causa, oportunamente, alguns tipos de infecção oral e vaginal nos seres humanos, pois está entre os muitos organismos que vivem na boca e no sistema digestivo humano, tendo seu crescimento suprido pela flora bacteriana já presente. As infecções causadas por fungos emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com algum tipo de imunodeficiência, como é o caso de pacientes imunodeprimidos, como os portadores da AIDS, pessoas que estão passando por algum tipo de quimioterapia, pacientes de uma unidade de tratamento intensivo. Devido a estes fatores, a *Candida albicans* tem despertado grande interesse das pesquisas na área de saúde. Sob circunstâncias normais, a *C. albicans* pode ser encontrada em 80% da população humana sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase, sendo assim a virulência e patogenicidade da *C. albicans* estão ligadas a diversos fatores, tal como a formação de hifas, que capacitam a célula para exercer força mecânica, ajudando na sua penetração nas superfícies epiteliais, e uma vez na corrente sanguínea apresenta uma ação danosa sobre o endotélio, o que permite que a *Candida albicans* invada os tecidos profundos do organismo e, em casos mais graves, a invasão dos tecidos hepático e pancreático (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Candida tropicalis*: é uma levedura que pertence ao gênero *Candida* e da ordem Saccharomycetales, quando associada a outras espécies do mesmo gênero pode ser considerada oportunista e causar a patologia denominada candidíase, pode estar presente também em onicomicoses, mais frequentemente em pacientes como HIV positivo (BROCK *et al.*, 2000).

- *Candida krusei*: são leveduras também presentes na patologia denominada candidíase, sendo um patógeno bastante resistente aos antifúngicos convencionais, como o fluconazol, sendo considerada de difícil tratamento, principalmente em pacientes imunodebilitados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Trichosporon beigelli*: corresponde a uma levedura, do gênero *Trichosporon*, que presente nas hastes dos pêlos do couro cabeludo, corpo e região púbica,

fazendo parte da flora normal, mas que pode causar em pacientes imunocomprometidos uma infecção superficial denominada de piedra branca, que é diagnosticada pela presença de várias lesões populares, eritematosas ou purpúricas disseminadas na superfície cutânea, sendo freqüentemente fatal (GUEHO *et al.*, 1994).

3.5.3 Atividade hemolítica

Alguns grupos químicos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas podem apresentar atividade hemolítica, sendo os principais o grupo das saponinas e dos alcalóides, sendo que esta atividade presente em algumas plantas é estimulada para realização do mecanismo de defesa aos predadores e, desta forma pode causar severos danos ao organismo humano (COSTA, 2002).

O mecanismo de toxicidade destas plantas ocorre através da hemólise dos eritrócitos, que por sua vez proporcionam a liberação da hemoglobina no plasma, o que pode proporcionar severos danos a órgãos vitais como o fígado, rins e coração (CARVALHO *et al.*, 2007).

Sendo assim a OMS sugere em seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais (1998) a realização dos testes para determinar a atividade hemolítica de plantas medicinais, bem como também no guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos sugeridos pela ANVISA (2003) deverá ser realizada como parte dos ensaios toxicológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1 Coleta e Identificação botânica

O material vegetal utilizado neste trabalho foi coletado de um exemplar da espécie de *Eucalyptus elata* localizado e cultivado no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), localizada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as coordenadas geográficas da cidade de Colombo são aproximadamente 49°13'W de longitude e 25°17'S de latitude e está a 920 metros acima do nível do mar.

Para a realização deste trabalho foram coletadas folhas adultas, caule e cascas de seu caule no período de Março à Junho de 2012, sendo que uma parte do material foi utilizada fresca e a outra parte foi deixada a temperatura ambiente, em local fresco e arejado até a secagem do material, buscando assim as características desejadas de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988-2005).

4.1.2 Secagem do material botânico

As folhas da espécie em estudo foram separadas dos galhos manualmente, sendo então armazenadas à sombra e temperatura ambiente, durante um período de 15 dias para total secagem das mesmas.

As cascas do caule foram retiradas por meio de material cortante e, juntamente com os caules, foram secas em estufa, com temperatura de 50°C, durante um período de 24 horas.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS

Foi utilizado o método gravimétrico perda por dessecação, para determinar o teor de substâncias voláteis presentes nas folhas secas, seguindo o proposto por WHO (1998).

Sendo assim utilizou-se uma amostra do material seco (5 g), que foi colocada em uma placa de petri previamente dessecada e pesada.

Em seguida a amostra foi mantida em estufa por 6 horas a 105°C e depois encaminhada para dessecador até completo resfriamento, para posterior realização da pesagem, sendo este procedimento foi repetido até que se obtivesse peso constante da análise.

O cálculo da porcentagem de substâncias voláteis totais presentes no material vegetal seco levou em consideração 5 g de amostra como 100% e realizou-se a regra da razão e proporção utilizando o valor da massa restante após o experimento, sendo este subtraído do utilizado no início, resultando assim no valor desejado.

5 g de amostra --- peso do material

100 g de amostra após o experimento --- y %

y = % de teor de sólidos

100 – y = % de substâncias voláteis presentes no material vegetal seco.

Para analisar a real quantidade de água presente na amostra foi calculada a massa de óleo evaporado neste mesmo ensaio, utilizando a seguinte fórmula:

$$d = \frac{m(g)}{v(mL)}$$

Onde:

v= volume de óleo presente, de acordo com o rendimento obtido na extração do óleo essencial;

d= densidade deste óleo obtida por ensaio com picnometro.

Obtendo assim por meio da subtração entre massa de óleo essencial e o valor de substâncias voláteis, o valor real de água encontrado no material vegetal.

4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada a partir das folhas frescas e secas, segundo a Farmacopéia Brasileira V ed. (2010), a extração foi realizada através da destilação por arraste de vapor d'água com aparelho de Clevenger, modificado por Wasicky (1963).

O procedimento foi realizado utilizando 100 gramas das folhas fragmentadas e que foram acondicionadas em um balão de 3 litros, em seguida adicionou-se água destilada, vinte vezes o seu peso, cerca de 2 litros e foi acoplado ao equipamento de Clevenger (FIGURA 9).

A extração ocorreu durante um período de 6 horas intermitentes, segundo a Farm.Bras. (2010), e decorrido o tempo de extração realizou-se a leitura final do volume de óleo e calculou-se a concentração em mL%.

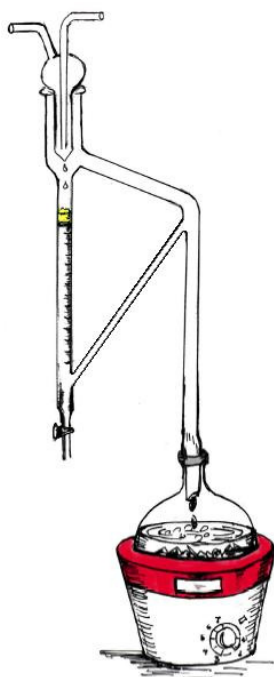


FIGURA 9 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO APARELHO DE CLEVINGER

Fonte: SINGER, 2005

4.3.1 Determinação do rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial foi calculado em % volume/ massa como sugerido pela Farm. Bras. (1988-2005), desta forma o volume corresponde ao volume de óleo essencial (mL) e a massa à quantidade em gramas do material vegetal utilizado para extração, sendo esta determinação realizada em triplicata.

4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

4.4.1 Densidade relativa

A análise da densidade relativa foi realizada por picnometria e em triplicata conforme solicitado pela Farm. Bras. (1988-2005) e a NBR 5784: Óleos essenciais – Determinação da massa específica e densidade relativa (ABNT, 1985a).

Sendo esta a razão entre densidade do óleo e a densidade da água à 20°C, utilizando o símbolo (d_{20}^{20}).

Seguiu-se o procedimento de limpeza do picnômetro e, em seguida realizou-se a pesagem do picnômetro vazio (PIC_{vazio}), em seguida a pesagem do picnômetro preenchido com água destilada ($PIC_{água}$). Para inserir a amostra no picnômetro realizou-se a secagem do equipamento e em seguida colocou-a dentro do mesmo e realizou-se a pesagem ($PIC_{amostra}$) a 20°C.

Encontrou-se desta forma o peso da amostra, realizando a subtração do peso do picnômetro cheio ($PIC_{amostra}$) e do picnômetro vazio (PIC_{vazio}), e para determinar a densidade utilizou-se a seguinte fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{(PIC_{amostra}) - (PIC_{vazio})}{(PIC_{água}) - (PIC_{vazio})}$$

4.4.2 Índice de refração

O índice de refração de uma substância pura é uma constante, mantidas as condições de temperatura e pressão e, como tal, pode ser usado como meio de identificação da mesma, no presente experimento o índice de refração (n_D^{20}) foi determinado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988-2005), utilizando o refratômetro ABBE do modelo ausJENA.

Para a realização da análise o refratômetro foi calibrado de forma que a 20°C, o índice de refração da água é de 1,3330 e o do etanol 85 % é de 1,3652, seguindo a NBR 5785: Óleos essenciais – Determinação do índice de refração (ABNT, 1985b).

4.4.3 Solubilidade em etanol

A determinação da solubilidade em etanol foi realizada de acordo com a Pharmacopea Helvética (1993), utilizando etanol 50, 60, 70, 80, 90% e etanol absoluto, sendo esta análise feita em triplicata.

Colocaram-se em uma bureta de 25 mL as diferentes concentrações de etanol e este foi gotejado sobre uma amostra de 0,1 mL do óleo essencial, após a solubilização total da amostra procedeu-se a leitura do valor de etanol gasto, estabelecendo desta forma a relação de solubilidade da amostra em razão do solvente.

4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

4.5.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v)

O preparo do extrato hidroalcoólico e o seu fracionamento foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Moreira (1979), modificada por Nakashima (1993). Sendo que os materiais vegetais utilizados foram as folhas, caule e cascas do caule.

Para a obtenção dos extratos brutos das partes acima citadas foi utilizada a técnica de maceração à temperatura ambiente, o material vegetal foram todos

fragmentados melhorando assim a extração, pelo aumento da superfície de contato do material com o líquido extrator, desta forma as folhas foram trituradas em processador de alimentos e os caules e cascas do caule foram fragmentados com auxílio de um material cortante.

A maceração foi realizada utilizando 40 gramas do material botânico os quais foram imersos em 200 mL de etanol 70% (v/v) e acondicionados em frasco de vidro âmbar devidamente fechado, em temperatura ambiente, durante 15 dias.

Após, completado este período, cada um dos extratos brutos foi filtrado em funil de vidro, com auxílio de papel filtro e depois de filtrados completou-se o volume para 200 mL com etanol 70% (v/v).

Uma alíquota de 10 mL destes extratos brutos foi transferida para placas taradas e levadas a estufa até completa secagem. Após, estes recipientes foram transferidos para um dessecador até completo resfriamento e pesados, para a determinação do teor de sólidos %, segundo a Farm. Bras. V ed. (2010). As análises de características organolépticas, as quais englobam cor, odor, sabor e pH, também foram determinados.

4.5.2 Fracionamento do extrato hidroalcoólico

Em seguida o restante dos extratos foi acondicionado em balão de vidro e levados para o evaporador rotatório Quimics Q344, para a concentração dos mesmos, até 1/5 do seu volume total (± 40 mL), a uma temperatura inferior a 50°C ($\pm 35^\circ\text{C}$) em B.M., visando a retirada do excesso de líquido extrator para diminuir a interferência deste no processo de fracionamento. Este procedimento foi realizado para cada extrato bruto do material vegetal a ser analisado.

Transferiu-se o extrato concentrado para um funil de separação e efetuou-se a extração por partição líquido/ líquido, com solvente de polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e o extrato final recomposto em etanol 70%).

Extraiu-se com 20 mL do solvente de cada vez (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), repetindo o processo por 5 vezes e separou-se a fase orgânica em recipientes rotulados com as denominações F1, F2, F3, F4 respectivamente.

Terminada a extração com o primeiro solvente *n*-hexano, levou-se o extrato ao B.M., até a evaporação total do líquido extrator, em seguida esfriou-se e procedeu-se nova extração líquido/ líquido com o segundo solvente diclorometano, repetiu-se este procedimento para todos os solventes subsequentes. O restante do extrato foi levado ao B.M. até a evaporação total do solvente butanol e em seguida foi recomposto com o etanol 70% até 100 mL, refazendo a fração F5 (hidroalcoólico).

Foi realizado o cálculo do rendimento obtido para cada um dos extratos, realizando a evaporação do líquido extrator em B.M. (ROBARDS, 2003; GLOWNIAK *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2010).

Terminada a extração com todos os solventes, as frações F1, F2, F3, F4 e F5 foram utilizadas para as pesquisa dos seguintes metabólitos secundários: alcalóides, esteróides e/ou triterpenóides, glicosídeos flavônicos, leucoantocianidinas, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas, saponinas, taninos e aminogrupos.

4.5.3 Análise fitoquímica dos metabólitos secundários

Esta análise seguiu o proposto por Nakashima (1993), sendo que os bioativos pesquisados e as reações de caracterização utilizadas para detectá-los qualitativamente nas frações obtidas foram respectivamente: flavonóides (reação de Shinoda, Pacheco, oxalo-bórica e lentilha de zinco), leucoantocianidinas (reação de ácido clorídrico fumegante), cumarinas (reação de NaOH-UV), antraquinonas (reação de Borntræger), alcalóides (reações com os reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer) e esteróides e/ ou triterpenos (reação de Liebermann-Buchard), em todas as frações e as reações de saponinas (índice afrosimétrico/ índice de espuma), taninos (reação com FeCl₃, solução de gelatina 2,5 %; cloridrato de emetina a 1 %) e aminogrupos (reativo de Ninhidrina), na fração 5.

4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO

4.6.1 Preparo dos extratos aquosos

Os extratos foram preparados com os órgãos vegetais folhas, caule e cascas do caule de acordo com Moreira (1979) e Nakashima (1993). Estes extratos foram obtidos por meio da técnica de maceração a temperatura moderada em B.M. (60 °C). Para o preparo foram utilizados 40 g de material botânico, os quais foram imersos em 200 mL de água destilada a temperatura constante de 60°C, pelo período de 2 horas.

Para um melhor rendimento na extração os órgãos vegetais foram fragmentados, sendo as folhas trituradas em processador de alimentos e os caules e as cascas dos caules fragmentados com o auxílio de um material cortante.

Terminada a extração com o solvente, os extratos foram filtrados tendo seus volumes completados com água destilada para 200 mL, sendo os mesmos acondicionados em frascos devidamente rotulados, fechados e sob refrigeração até seu momento de uso.

Foi calculado o rendimento obtido para o extrato realizando a evaporação do líquido extrator em B.M. (ROBARDS, 2003; GLOWNIAK *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2010).

Com uma alíquota destes extratos aquosos foram realizadas as análises de características organolépticas, as quais englobam cor, odor, sabor e pH, e foi determinada a do teor de sólidos seguindo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988-2005).

4.6.2 Caracterização dos metabólitos secundários

Este experimento seguiu o proposto por Nakashima (1993), sendo os bioativos pesquisados e as reações de caracterização utilizadas para caracterizá-los qualitativamente foram respectivamente: glicosídeos antociânicos (coloração pelo caráter anfótero), glicosídeos saponínicos (reação de formação de espuma), glicosídeos cianogênicos (reação com papel picro sódico) e reação de Schoembain, aminogrupos (reação de Ninhidrina), ácidos voláteis (detecção de pH), ácidos fixos

(reação com reativo de Nessler), taninos em geral (reação com cloreto férrico, sulfato de ferro amoniacal, solução de gelatina, cloridrato de emetina) e taninos hidrolisáveis e condensados (reação com ácido clorídrico fumegante e formaldeído).

4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.7.1 Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foram realizadas duas técnicas: o método do fosfomolibdênio e o do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila-DPPH, seguindo o experimento desenvolvido por Negri, Possamai e Nakashima (2009), com algumas modificações, sendo estes dois métodos utilizados para determinar o possível potencial antioxidante de plantas, buscando assim antioxidantes naturais, como os utilizados frequentemente como é o caso das vitaminas C e E, os flavonóides, principalmente a rutina e os taninos, em especial o ácido gálico (SOARES, ANDREAZZA, SALVADOR, 2005).

4.7.1.1 Método do fosfomolibdênio

A técnica identifica a capacidade antioxidante total das amostras, sendo que esta se baseia na capacidade de redução do molibdênio (Mo) VI em molibdênio V, que em meio ácido e em presença de um agente redutor forma um complexo de coloração verde fosfato/ Mo V, o qual tem a intensidade de cor detectada pelo equipamento de UV/VIS a 695 nm e desta forma é atribuído o poder antioxidante total da amostra (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Inicialmente foram preparadas em metanol as soluções mãe (SM) de cada fração obtida dos materiais vegetais (folha, caule e cascas do caule), para esta análise foram selecionados os extratos etanólicos brutos e as frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica, visto que estas apresentaram resultado positivo para polifenóis segundo a análise fitoquímica e pela sua polaridade, possibilitando assim apresentar evidente atividade antioxidante devido à estrutura química e

propriedades redutoras destes compostos. As concentrações das amostras usadas no experimento foram de 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ mL de metanol.

Para o preparo do meio reacional uma alíquota de 100 µL de SM para cada fração (folha, caule e casca do caule) e extratos brutos foram acondicionadas em tubos de ensaio, e em seguida, nestes mesmos tubos, foram adicionados 1 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mmol.L⁻¹, fosfato de sódio 28 mmol.L⁻¹ e ácido sulfúrico 0,6 mol.L⁻¹).

Os tubos foram hermeticamente fechados e levados para B.M. a 95°C por 90 minutos, após este período, os tubos foram resfriados e efetuou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu 1601) utilizando o comprimento de onda de 695 nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata e como branco foi utilizado 100 µL de metanol com 1 mL do reativo.

As substâncias referências utilizadas foram o ácido ascórbico, a rutina e o ácido gálico, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ mL. Uma curva analítica foi construída com os valores de absorvância do ácido ascórbico nas diferentes concentrações, obtendo assim a equação da reta que foi utilizada para determinar a capacidade antioxidante total das amostras e padrões de referência e que será expresso em µg de ácido ascórbico/ g de extrato.

Este resultado também pode ser expresso em porcentagem de atividade antioxidante, considerando o ácido ascórbico como 100% da atividade antioxidante e desta forma a porcentagem de atividade antioxidante encontrada nas frações será comparada com a do ácido ascórbico através da fórmula:

$$\% \text{ de AA} = \frac{\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}}{\text{Abs do Ác. Ascórbico} - \text{Abs do branco}} \times 100$$

4.7.1.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

O presente método se baseia na capacidade que algumas plantas possuem em captar o radical livre DPPH, o método utilizado foi baseado em Blois (1958) e modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), e na metodologia de Sousa *et al.* (2007) com modificações, as quais consideram que a utilização de um radical

cromóforo muito estável, de cor violeta e absorção máxima em 517 nm, o DPPH, quando na presença de substâncias com capacidade redutoras, como os chamados compostos antioxidantes, sofrem uma redução pela ação dos antioxidantes, ou seja, a redução do radical livre estável DPPH a partir da doação de um hidrogênio, obtendo desta maneira a alteração de sua coloração que parte do violeta para a amarela, e assim a absorvidade passa de 517 nm para valores ainda menores, proporcionalmente à concentração do composto redutor na amostra, como mostra a FIGURA 10.

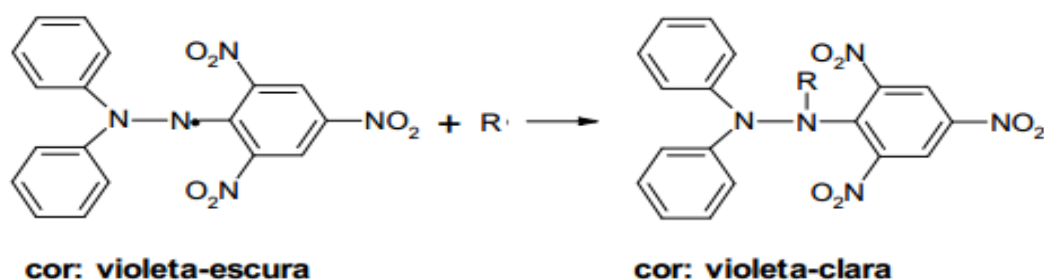


FIGURA 10 - MOLÉCULA DE DPPH, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON (ESTABILIZAÇÃO)

Fonte: BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995

A intensidade de cor violeta lida no espectrofotômetro será inversamente proporcional à concentração de substâncias redutoras presentes na amostra como mostra a FIGURA 11.

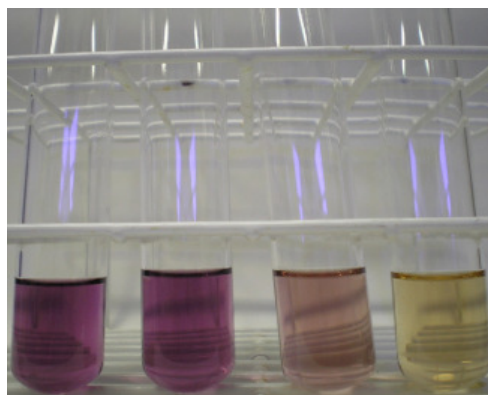


FIGURA 11 - MOLÉCULA DE DPPH ESTABILIZADA EM DIFERENTES ETAPAS

Fonte: Autor (2012)

Apesar da reação com o DPPH geralmente ocorrer de forma bastante rápida, como é o caso do antioxidante ácido ascórbico, no qual a reação ocorre em cerca de menos de 1 minuto, algumas outras moléculas podem ter uma cinética de reação bem diferenciada, como é o caso da vitamina E, que demora cerca de 5 a 30 minutos para reagir, ou então do BHT (butil-hidroxitolueno) e do BHA (butil-hidroxianisol) que são evidentemente mais lentos, podendo estes levar cerca de horas para reagir. Estas características estão provavelmente correlacionadas com a quantidade de hidroxilas existentes na molécula do antioxidante, ou seja, quanto mais hidroxilas, maior o seu potencial antioxidante, pois existem moléculas antioxidantes que doam átomos de hidrogênio para que haja a estabilização do radical livre ou também pelo impedimento estérico da molécula de DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Inicialmente foram preparados 50 mL de uma solução de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, sendo estes mantidos sob refrigeração e sob proteção de luz até seu momento de uso. A partir desta solução foram realizadas diluições nas concentrações de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, e 1 µg/mL, em seguida foram realizadas as leituras das absorvâncias de todas as concentrações no comprimento de onda de 517 nm, utilizando o espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu 1601), com a finalidade de construção de uma curva analítica e obtenção da equação da reta. As leituras das absorvâncias foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 minuto entre cada leitura.

Para esta análise foram utilizados extratos etanólicos brutos das folhas, caule, cascas do caule e suas frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica, pois apresentaram resultado positivo para polifenóis segundo a marcha fitoquímica, todas as amostras foram concentradas em evaporador rotativo, e em seguida foram preparadas soluções metanólicas nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL. Nos 3 mL de que compunham a solução teste, 2,7 mL eram de solução metanólica de DPPH a 40 µg/mL e 0,3 mL da amostra a ser testada, que após o seu preparo foram reservadas em ambiente protegido de luz e aguardou-se 30 minutos para que ocorra a reação. Após o referido tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu 1601) em 517 nm.

Os ensaios foram sempre realizados em triplicata, utilizando no tubo branco a mistura de 2,7 mL de metanol e 0,3 mL da solução metanólica de DPPH a 40 µg/mL.

Como substâncias-referência foram empregadas o ácido ascórbico (vitamina C), a rutina e o ácido gálico nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL em metanol.

Com os valores das médias das absorvâncias no tempo de 30 minutos (n=3) e a equação da reta da curva analítica do DPPH, é possível determinar a concentração de DPPH remanescente em cada uma das amostras e padrão de referência. E assim com os resultados obtidos a partir da equação da curva e dos valores das absorvâncias para cada concentração testada, pôde-se calcular os percentuais de DPPH remanescentes (%DPPH_{REM}) utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=t}}{[\text{DPPH}]_{T=0}} \times 100$$

Onde:

[DPPH]_{T=t} corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato;

[DPPH]_{T=0} é a concentração inicial de DPPH (40 µg/mL).

Com os resultados das absorvâncias obtidos em todas as concentrações testadas no tempo de 30 minutos, foram realizados gráficos da % de atividade antioxidante X concentração em µg/mL, no qual a % de atividade antioxidante foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de A.A.} = \frac{\text{Abs.}_{\text{controle}} - (\text{Abs.}_{\text{amostra}} - \text{Abs.}_{\text{branco}})}{\text{Abs.}_{\text{controle}}} \times 100$$

No qual:

Abs_{controle} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH;

Abs_{amostra} é a absorvância da mistura de DPPH + amostra, no tempo de 30 minutos e Abs_{branco} corresponde a absorvância do branco (metanol + solução metanólica de DPPH).

Também foi determinado o CE 50, ou seja, concentração eficiente 50, que corresponde a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, utilizando uma curva linear de 1º grau, colocando na abscissa o valor das concentrações da amostra ou padrão de

referência em $\mu\text{g/ mL}$ e na ordenada a porcentagem de DPPH remanescente (DPPH_{REM}).

4.7.2 Atividade antimicrobiana

4.7.2.1 Microorganismos

No presente experimento foi analisada a possibilidade de inibição de crescimento de oito cepas-padrão de bactérias, provenientes da empresa NEWPROV®, e foram reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor, sendo quatro destas cepas representadas por bactérias Gram negativas *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e as outras quatro cepas, representadas pelas bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Nas análises antifúngicas, foram utilizadas cinco cepas-padrão de leveduras: *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Trichosporon beigelli*, sendo todas estas isoladas e provenientes do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas (Curitiba-Pr).

4.7.2.2 Meio de Cultura

Para a realização das análises antimicrobianas foram utilizados os meios de cultura Mueller-Hinton ágar e Mueller-Hinton caldo para o crescimento das bactérias e para os testes antifúngicos foram utilizados os meios de cultura Sabouraud ágar e Sabouraud caldo para o crescimento das leveduras.

Todos os meios utilizados no presente experimento foram preparados de acordo com as informações do fabricante e, em seguida seguiram para autoclavagem durante 20 minutos a 121°C , a pressão de 1 atm.

As placas foram preparadas em capela de fluxo laminar Classe II, adicionando o meio de cultura nestas e deixando-as em repouso até sua completa solidificação.

4.7.2.3 Preparo do inóculo

Tanto as leveduras quanto as bactérias foram inoculadas em placas de Petri pequenas (90 mmx 15 mm) contendo meio de cultura específico para o microrganismo em questão para que houvesse o crescimento das mesmas, desta forma, para as bactérias foi utilizado o ágar Mueller-Hinton, o qual foi incubado em estufa a 35°C por 24 horas e para as leveduras foi utilizado o ágar Sabouraud, o qual foi incubado em estufa a 28°C, por 48 horas.

Após o referido período para crescimento das bactérias e leveduras, as mesmas foram inoculadas em solução salina estéril (0,9%) e padronizadas na concentração de 10^8 UFC/mL, por comparação ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland.

4.7.2.4 Difusão em meio sólido a partir de orifício

Este teste foi realizado com o intuito de investigar de forma preliminar a possível capacidade antimicrobiana dos extratos brutos das folhas, caule, cascas do caule e o óleo essencial de *E. elata* em diferentes concentrações, sendo utilizada a técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício (BAUER *et al.*, 1966; ALVES *et al.*, 2000; ANTUNES *et al.*, 2006; AYRES *et al.*, 2008), com algumas modificações, seguindo as recomendações do NCCLS/ CLSI (2005).

As bactérias foram plaqueadas em triplicata e em meio estéril, com auxílio de swab estéril e em seguida com o auxílio de ponteiros estéreis descartáveis realizou-se a perfuração do meio sólido, obtendo assim cavidades com 8 mm de diâmetro, as quais acondicionaram aproximadamente de 20 µL de cada amostra e dos controles negativos (solventes utilizados durante o experimento).

Posteriormente houve a preparação das diluições do extrato bruto das folhas, caule e cascas do caule em seis diferentes concentrações, partindo da concentração inicial de 2000 µg/mL, e obtendo as demais concentrações pelo processo de diluição seriada (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL), sempre completando este volume com o solvente selecionado para a diluição, neste caso o álcool 70% (v/v).

Depois de preparadas as 6 diluições, adicionou-se uma alíquota de 20 µL dos extratos diluídos nas diferentes concentrações dentro das cavidades e em seguida levaram-se as placas para estufa a 35°C por 24 horas, e após o decorrido tempo verificou-se a formação de um halo de inibição ao redor de cada cavidade.

Para realizar o mesmo teste com o óleo essencial foram realizadas 4 diluições, realizando o processo de diluição seriada 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, sempre completando este volume com o solvente selecionado para a diluição, neste caso o dimetil-sulfóxido (DMSO).

Depois de preparadas as 4 diluições, adicionou-se uma alíquota de 20 µL do óleo diluído nas diferentes concentrações dentro das cavidades e em seguida levou-se as placas para estufa a 35°C por 24 horas, e após o decorrido tempo verificou-se formação de um halo de inibição ao redor de cada cavidade.

Todos os materiais que foram utilizados no presente experimento foram esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C em pressão de 1 atm, e o procedimento seguido foi o mesmo tanto para os extratos brutos quanto para o óleo essencial.

Como controles negativos foram utilizados o álcool 70% (v/v) e o dimetil-sulfóxido (DMSO), sendo estes os mesmos empregados para o preparo das diluições.

Para o teste de controle positivo, foi empregada a técnica de difusão em disco frente às mesmas 8 bactérias utilizadas anteriormente, aplicando antibióticos padrão da empresa NEWPROV®, sendo estes a gentamicina 10 µg, ampicilina 10 µg, eritromicina 15 µg, penicilina 10 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg, sendo esta metodologia descrita por Bauer (1966), distribuindo-os no meio de cultura Mueller-Hinton já plaqueado com as bactérias.

Após 30 minutos, as placas de Petri contendo bactérias foram incubadas invertidas em estufa à 35°C por 24 horas e as que continham as leveduras em estufa à 28°C por 48 horas.

Após o referido período das incubações as zonas dos halos de inibição ao redor de cada cavidade foram medidas, utilizando uma régua graduada (em mm) e a partir destes valores foi realizada a média (USP XXVIII, 2005).

4.7.2.5 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

No presente experimento foram estabelecidas a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM), utilizando o óleo essencial e os extratos brutos de *E. elata* em diferentes concentrações. A CIM foi determinada de acordo com alguns métodos com modificações (CHÉRAIF *et al.*, 2007; AYRES *et al.*, 2008; HANAMANTHAGOURA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

Os micro-organismos empregados no experimento foram as mesmas oito cepas padrão de bactérias utilizadas no método de difusão em meio sólido e as cinco leveduras.

Todos os materiais que foram utilizados no presente experimento foram esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C em pressão de 1 atm, e o ensaio foi realizado utilizando microplacas estéreis com fundo chato, contendo 96 poços.

Em cada orifício da microplaca estéril foram acondicionados, com auxílio de uma micropipeta multicanal, 100 µL de caldo Mueller-Hinton para as bactérias e caldo Sabouraud Dextrose para as leveduras e em seguida foram distribuídos em cada um dos primeiros orifícios da placa 100 µL dos extratos das folhas, do caule, e das cascas do caule preparados numa concentração de 2000 µg/mL, diluídos em etanol 70% (v/v), em seguida uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da primeira linha foi transferida para o orifício subsequente, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para os orifícios da sequência, repetindo-se este processo, obtendo assim uma diluição 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32,

1:64, 1:128 e 1:256, sendo assim uma concentração decrescente do extrato (2000 a 15,625 µg/mL) por meio de diluição seriada com o próprio meio de cultura.

Os inóculos de crescimento recente (24 horas) na concentração de 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC/ mL) foram diluídos 1:10 em solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma concentração final da suspensão bacteriana de 10^4 UFC/ mL, e desta diluição foram depositados um volume de 10 µL em cada orifício da microplaca.

Nas colunas 10, 11 e 12 foram adicionados os controles negativos, sendo estes os solventes utilizados como diluentes, o etanol 70% (v/v) e o tween 80 (10%), como controle positivo foi utilizando como antimicrobiano eritromicina na concentração de 30 µg/mL e os antifúngicos cetoconazol na concentração de 50 µg/mL e a terbinafina na concentração de 50 µg/mL, como controle de esterilidade utilizou-se o meio de cultura puro, sendo as análises realizadas em triplicata.

Posteriormente, as placas contendo bactérias foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e as leveduras foram incubadas a $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após, decorrido este tempo adicionou-se em cada uma das cavidades da microplaca 20 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico (TCC) 0,5% (p/v) em metanol e em seguida foram re-incubadas por mais uma hora a referida temperatura, para verificar o crescimento dos micro-organismos.

A presença de uma coloração róseo-avermelhada foi interpretada como prova negativa da inibição de crescimento pela amostra, em contrapartida a transparência da solução presente no orifício indicou reação positiva a atividade inibitória da amostra. O CIM representa a menor concentração em µg/mL em que a amostra conseguiu inibir o crescimento dos micro-organismos, ou seja, ausência da coloração rosa.

Desta forma as amostras que apresentaram valores de CIM menores do que 10 µg/mL foram consideradas excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL foram consideradas de boa atividade, valores entre 100 e 500 µg/mL foram considerados de atividade moderada e por fim valores acima de 500 µg/mL foram considerados de baixa atividade (MACHADO *et al.*, 2005)

O mesmo teste foi realizado para o óleo essencial na concentração de 2000 µg/mL, diluído em tween 80 (10%), obtendo assim uma diluição seriada de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256, nas seguintes concentrações 1 mg/mL, 0,5

mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL, 0,0078125 mg/mL.

Foram necessárias 26 placas para o ensaio que fosse realizado em triplicata, com os 3 extratos etanólicos brutos (folha, caule e cascas do caule) e o óleo essencial frente aos 13 micro-organismos e controles positivo, negativo e controle de esterilidade do meio.

A FIGURA 12 demonstra a forma de padronização das microplacas estéreis para a determinação da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos brutos das folhas, caule, cascas do caule de *E. elata* e os controles positivos, negativos e controle de esterilidade do meio frente os diferentes micro-organismos utilizados durante esta análise. Em cada poço da microplaca havia o meio de cultura indicado para cada micro-organismo, o micro-organismo e a amostra a ser testada em diferentes diluições.

A FIGURA 13 padronização das microplacas estéreis para a determinação da atividade antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial de *E. elata* e a organização dos controles positivos, negativos e controle de esterilidade do meio frente os diferentes micro-organismos utilizados durante esta análise.

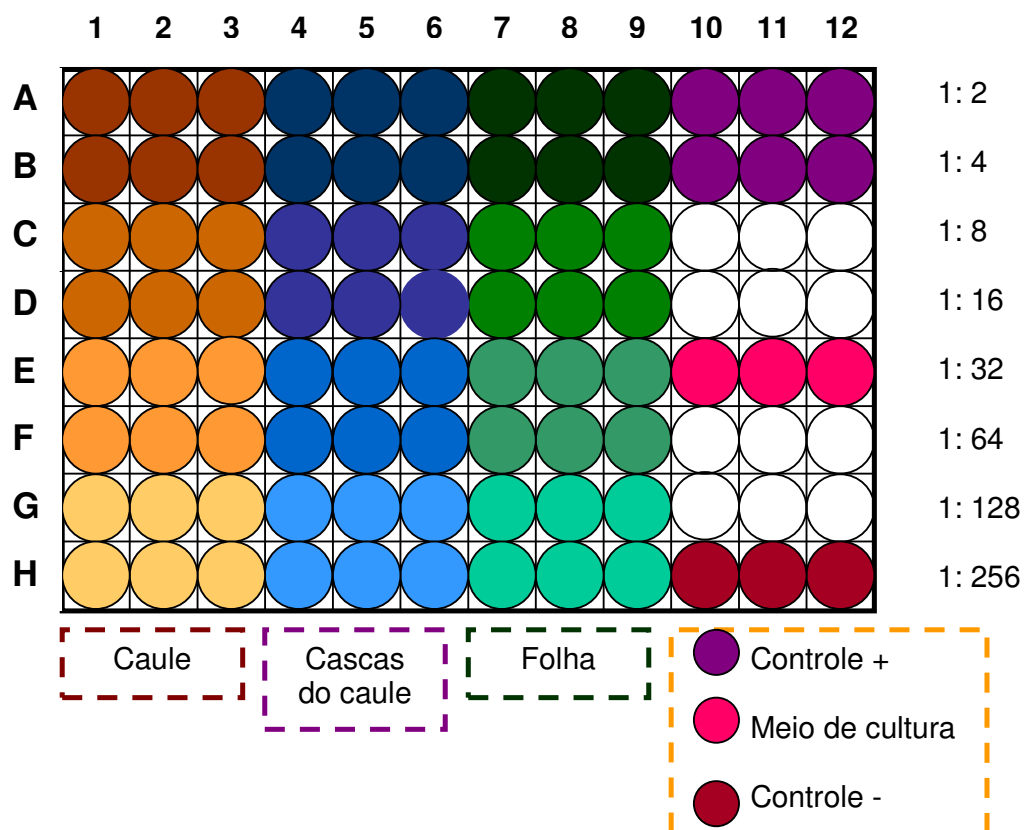


FIGURA 12 - PADRONIZAÇÃO DAS MICROPLACAS ESTÉREIS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS, CAULE, CASCAS DO CAULE DE *E. elata* E ORGANIZAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS, NEGATIVOS E CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO, FRENTE AOS DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE ESTA ANÁLISE.

Fonte: Autor (2013)

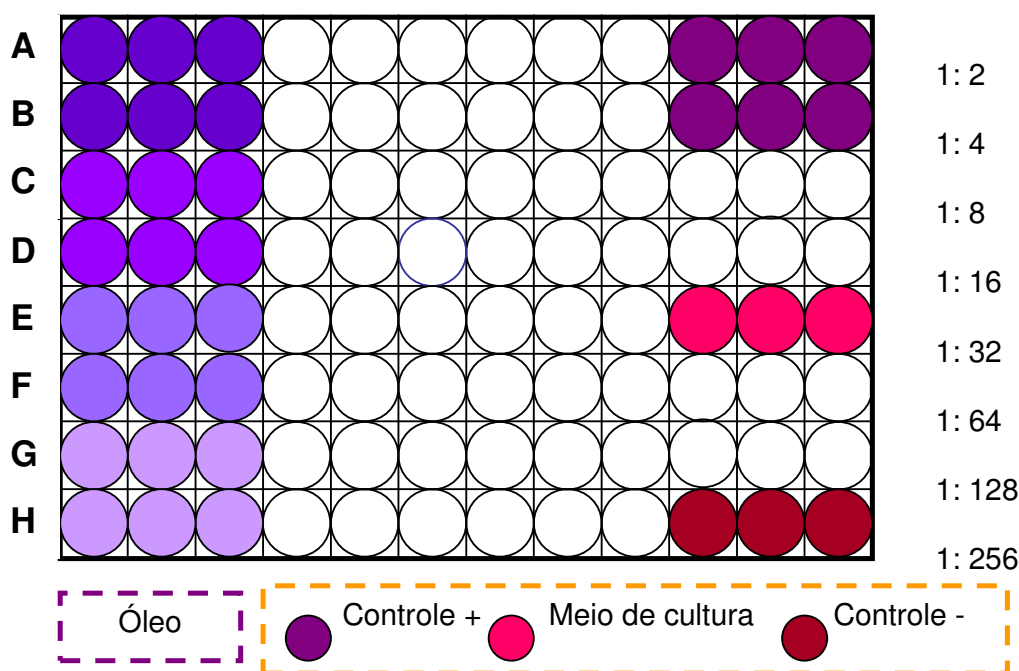


FIGURA 13 - PADRONIZAÇÃO DA MICROPLACA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. elata*, E ORGANIZAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS, NEGATIVOS E CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO, FRENTE AOS DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE ESTA ANÁLISE.

Fonte: Autor (2013)

4.7.2.6 Investigação preliminar para a determinação da concentração bacteriostática/ bactericida mínima (CBM) e concentração fungistática/ fungicida mínima (CFM)

A metodologia descrita por Veljic e colaboradores (2010) foi utilizada para realizar a determinação desta atividade, sendo que seu intuito é determinar a capacidade da amostra em inibir crescimento ou provocar a morte dos micro-organismos, porém outras análises mais específicas, como mecanismo de ação de inibição de crescimento ou de morte dos micro-organismos, deverão ser realizadas para determinar as atividades bactericidas/ bacteriostáticas e fungicida/fungistáticas.

Para isso, foram repicados 10 µL dos poços que possuíam a concentração inibitória mínima (CIM) em placas contendo o meio Mueller-Hinton para as bactérias (incubação de 24 horas a 35°C ± 1°C), e meio Sabouraud para as leveduras (incubação de 48 horas a 28°C ± 1°C). Após decorrido o período, a concentração bactericida e fungicida mínima foram determinadas nas amostras, que não apresentaram crescimento microbiano visível após a repicagem e incubação,

demonstrando a morte de 99,5% dos micro-organismos presentes no inóculo, tendo assim, uma grande possibilidade de possuir atividade bactericida/ fungicida. As amostras que demonstraram crescimento dos micro-organismos após a repicagem e incubação para o teste de CBM ou CFM foram pré-avaliados como bacteriostáticos/ fungistáticos, respectivamente (VELJIC *et al.*, 2010).

4.7.3 Atividade Hemolítica

4.7.3.1 Determinação da atividade hemolítica em placas contendo ágar sangue de carneiro

A atividade hemolítica do óleo essencial e dos extratos brutos das folhas, caule, cascas do caule e suas frações de *E. elata* foi analisada através da metodologia de difusão em ágar, sendo esta a mesma descrita por Flach, Karnopp, Corção (2005), na técnica de antibiograma em discos com modificações.

Foram preparadas placas de ágar sangue, utilizando sangue de carneiro estéril desfibrinado da marca NEWPOV® e nestas foram distribuídos discos de papel estéreis impregnados com 20 µL das alíquotas na concentração de 1000 µg/mL.

Como controles foram utilizados 20 µL dos solventes diluentes puros, etanol 70% (v/v), butanol, acetato de etila, diclorometano, *n*-hexano e Tween 80 (10%) aplicados nos discos de papel estéreis. Para o controle positivo foi utilizada uma solução de saponina, na concentração de 1000 µg/mL, sendo aplicado o mesmo volume de 20 µL sobre o disco de papel estéril, e para o controle negativo utilizou-se 20 µL de solução salina estéril na concentração de 0,9% sobre um disco de papel estéril. Todos os controles receberam o mesmo tratamento das amostras, sendo aplicados sob o disco de papel estéril e secas a temperatura ambiente e aplicados sob as placas.

Cada placa de ágar sangue foi dividida em 4 partes e em cada um destes espaços foi distribuído um disco estéril contendo as diferentes substâncias, sendo necessário realizar o teste em triplicata. Portanto, para isto foram utilizadas 9 placas para realizar o teste com todas as amostras e os controles (FIGURA 14).

Após, os meios foram incubados a 35°C durante o período de 24 horas. As placas foram analisadas quanto à presença de halos de hemólise, sendo estes medidos em milímetros.

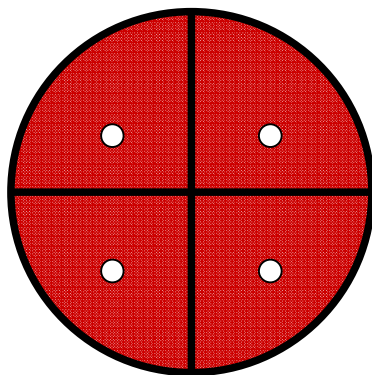


FIGURA 14 - MODELO DISPOSIÇÃO NA PLACA DE ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO PARA O TESTE DE HEMÓLISE
Fonte: Autor (2013)

4.7.3.2 Determinação da atividade hemolítica em tubos de vidro contendo sangue de carneiro a 2%

A atividade hemolítica de extratos vegetais, ou de uma preparação contendo saponinas, é determinada por comparação com a atividade de uma referência de saponina com atividade hemolítica de 1000 unidades por grama. Uma suspensão de eritrócitos é misturada com volumes iguais de uma diluição em série do extrato. A menor concentração a provocar hemólise completa é determinada após deixar o sistema em repouso por um período específico de tempo. Um teste similar é feito simultaneamente com solução de referência de saponina. Esta metodologia foi baseada pela descrita na Farm. Bras. V ed. (2010) para determinação da atividade hemolítica de extratos vegetais com algumas modificações.

Preparou-se uma suspensão utilizando sangue de carneiro desfibrinado da marca NEWPROV®, com o auxílio de um balão volumétrico de 50 mL, dilui-se cuidadosamente, 1 mL de sangue do carneiro desfibrinado, com quantidade suficiente de tampão fosfato pH 7,4. Essa suspensão sangue diluída (2%) pode ser

utilizada durante o tempo em que o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor, sendo mantida a uma temperatura entre 2°C e 4°C, após o preparo.

Para a solução de referência, preparou-se uma solução de saponina na concentração de 1000 µg/mL, completando o volume com tampão fosfato pH 7,4 (essa solução deve ser recém-preparada). Os extratos brutos, suas frações e o óleo essencial foram preparados e diluídos como especificado em cada etapa do teste, utilizando-se, também, tampão fosfato pH 7,4. Sendo os testes subdivididos nas etapas citadas abaixo.

4.7.3.3 Teste preliminar para determinação da atividade hemolítica em tubos de vidro contendo sangue de carneiro a 2%

Foram realizadas uma série de diluições partindo do extrato vegetal bruto 1000 µg/mL, utilizando tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue de carneiro desfibrinado (2%) e 4 tubos de ensaio conforme a TABELA 1.

TABELA 1 - DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DO TESTE PRELIMINAR

Tubo	1	2	3	4
Extrato vegetal (mL)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (mL)	0,90	0,80	0,50	-----
Suspensão de sangue (2%) (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00

Fonte: Farm. Bras. V ed., 2010

Assim que preparados os tubos foram invertidos cuidadosamente para misturar, evitando a formação da espuma, aguardou-se por 30 minutos e agitou-se novamente, deixando-se em repouso por mais 150 minutos e então levaram-se os tubos à centrífuga por 5 minutos a 3000 rpm. Após este procedimento os tubos foram examinados e anotou-se em qual diluição ocorreu hemólise total, o que é determinado pela presença de um líquido límpido, vermelho e sem depósito de eritrócitos. Se a hemólise total for observada apenas no tubo de número 4, deve-se utilizar o extrato vegetal original diretamente para o teste principal. Se a hemólise total for observada nos tubos 3 e 4, deve-se diluir duas vezes o extrato original com tampão fosfato e por fim, se a hemólise total for observada nos tubos 2, 3 e 4, preparar uma solução diluída cinco vezes, como descrito acima. Se, após 6 horas,

todos os tubos contiverem um líquido límpido e vermelho, preparar uma solução diluída 10 vezes e fazer o teste preliminar, como descrito acima. Se a hemólise total não for observada em nenhum dos tubos não se faz necessário realizar a análise do teste principal.

Segundo Meyer e col. (1982) para uma amostra ser considerada ativa, em relação à toxicidade, ela deverá apresentar uma DL 50 inferior a 1000 µg/mL.

4.8 Análises estatísticas

Inicialmente foi realizada a análise de variância (ANOVA), para análises de diferenças significativas e para os valores que apresentaram significâncias foi realizado o teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade. Estas análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DAS FOLHAS SECAS

No presente ensaio foi analisado teor de umidade utilizando as folhas secas de *E. elata*, as quais foram também empregadas para a extração do óleo essencial, e o resultado obtido foi de $11,98 \pm 0,89\%$ (TABELA 2). Com a subtração do valor do óleo essencial presente nas folhas secas a umidade destas foi estabelecida em $9,25 \pm 0,25\%$.

A porcentagem encontrada está entre o teor máximo de umidade, que fica entre 8% e 14%, estabelecido em diferentes farmacopéias (Farm. Bras., 1988-2005; Farmacopea Helvética, 1993; FARIAS, 2007; MALINOWSKI, 2010).

TABELA 2 - TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS PRESENTES NAS FOLHAS SECAS DE *E. elata*

Amostras	Teor de substâncias voláteis
1	12,05
2	12,84
3	11,05
Média e variação	$11,98 \pm 0,89$

Valores expressos em média \pm desvio (n=3)

5.2 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

5.2.1 Rendimento do óleo essencial

Conforme esperado os resultados obtidos a partir desta análise apresentaram um melhor rendimento para a extração de óleo essencial das folhas secas do que quando comparado ao das folhas frescas, já que é sabido que nas folhas frescas existe uma quantidade significativa de umidade, outra possível explicação foi proposta por Babu e Singh (2009) sugerindo que o fato das folhas frescas possuírem a presença de cera epicuticular, a mesma pode causar uma hidrodestilação incompleta do óleo essencial presente nas glândulas.

Durante o processo de extração tornou-se notável que a maior quantidade de óleo essencial foi extraída durante a primeira hora da hidrodestilação, e nas cinco horas restantes o processo de extração se manteve, porém em menores proporções, informação que foi verificada de forma semelhante nas espécies *E. benthamii*, *E.*

cinerea, *E. smithii*, *E. globulus* ssp. *bicostata* e *E. badjensis* (BOSCARDIN, 2009; MALINOWSKI, 2010, ANTONIO, 2011). O óleo essencial extraído das folhas secas de *E. elata* apresentou odor bastante odorífero e de coloração amarelada como pode ser observado na FIGURA 15.



FIGURA 15 – ÓLEO ESSENCIAL DE *E. elata*, EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE HIDRODESTILAÇÃO
Fonte: Autor, 2012

A TABELA 3 mostra os resultados obtidos durante o processo de hidrodestilação das folhas frescas e secas, coletadas no outono de 2012, utilizando o aparato de Clevenger.

TABELA 3 - RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *E. elata* POR HIDRODESTILAÇÃO

Rendimento do óleo essencial (mL/ 100g)	
Folhas Secas	Folhas Frescas
5,05	2,4
5,7	3,1
5,5	2,5
5,416667 ± 0,33%	2,666667 ± 0,37%

Valores expressos em média ± desvio (n=3)

Pode-se observar a partir destes dados que o melhor rendimento obtido foi o encontrado na extração de óleo essencial de folhas secas de *E. elata*, com uma porcentagem de $5,4 \pm 0,33\%$, enquanto a das folhas frescas foi de $2,6 \pm 0,37\%$. Pôde-se também comparar o rendimento da extração de óleo essencial extraído de folhas de diversas espécies de eucalipto coletadas na mesma época do ano, bem como em épocas distintas e foram constatadas desigualdades bastante relevantes

como nas folhas frescas de *E. globulus* que tem seu rendimento em 1,06% (SILVA; BRITO; JUNIOR, 2006). Entretanto o *E. globulus* subespécie *bicostata* apresentou o seu maior rendimento no outono, de folhas secas, obtendo assim o valor de 5,75% (MALINOWSKI, 2010), na mesma época as folhas secas de *E. cinerea* demonstram um rendimento de 3,8%, porém o maior rendimento desta espécie foi obtido no verão com o valor de 5,02% (SILVA, 2012) e por fim as folhas secas de *E. badjensis* apresentaram 4% de rendimento (ANTONIO, 2011).

Em seu estudo Mantero e colaboradores (2007) pesquisaram o rendimento na produção de óleo essencial obtido das folhas frescas de 9 espécies de eucaliptos, obtendo resultados de grande valia para esta análise, com um rendimento de $1,4 \pm 0,32\%$ para a espécie de *E. globulus* ssp. *maidennii*, de $1,25 \pm 0,78\%$ para a espécie de *E. badjensis*, sendo que na Austrália conseguiu-se obter um rendimento ainda superior para esta espécie utilizando as mesmas condições experimentais, com um rendimento de 2,8%, obteve-se também um rendimento de $1,23 \pm 0,43\%$ para *E. viminalis*, de $1,05 \pm 0,48\%$ para o *E. globulus* ssp. *globulus* e por fim, um rendimento de 1% para a espécie de *E. bosistoana* F.v.M.

A partir destes estudos verificou-se que existem grandes divergências de rendimento na extração de óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* em razão da sazonalidade, sendo este fenômeno em partes explicado pelo balanço dinâmico na síntese de terpenos, estando diretamente relacionado com a atividade metabólica do eucalipto e sua utilização pela planta (BOLAND; BROPHY; HOUSE, 1991¹¹ apud VITTI e BRITO, 2003).

5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

Estas análises foram realizadas com o intuito de estabelecer parâmetros de controle de qualidade dos óleos essenciais de *E. elata*.

A ISO 770-1980 preconiza valores para as propriedades físico-químicas do óleo essencial das folhas secas de *E. globulus* e que estão devidamente expressos na TABELA 4.

TABELA 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, E OS VALORES PRECONIZADOS PELA ISO 3095-1974

Análise	Resultado	ISO 770-1980
Densidade relativa	0,919	0,906 – 0,925
Índice de refração	1,464	1,4590 – 1,4670
Solubilidade em etanol 70%	1:2	1:5

Valores expressos em média \pm desvio (n=3)

5.3.1 Densidade relativa

A *International Standard Organization* (ISO) determina valores específicos para a densidade relativa de óleos essenciais com altas concentrações de cineol (ISO – 3065), estando entre 0,906 – 0,925 g/mL. Já para os óleos essenciais ricos em citronelal (ISO – 3044) os valores da densidade relativa devem estar entre 0,858 – 0,877 g/mL, e para fins de controle de qualidade a ISO 770 determina que a densidade relativa do óleo essencial de *E. globulus* deverá estar entre 0,906 e 0,925 g/mL (VITTI; BRITO, 2003).

O óleo essencial extraído das folhas secas de *E. elata* apresentou uma densidade relativa 0,919 g/mL. Para que o óleo essencial seja considerado medicinal sua densidade deverá estar entre 0,91 a 0,93 g/mL, sendo assim o óleo essencial de *E. elata* está dentro dos valores especificados (GUENTHER, 1961).

5.3.2 Índice de refração

Segundo Vitti e Brito (2003) os óleos essenciais ricos em cineol devem possuir índice de refração entre 1,4580 – 1,4650, entretanto os óleos com altas concentrações de citronelal devem apresentar o índice de refração com valores entre 1,4500 – 1,4590 e, o óleo essencial de *E. globulus* deve apresentar valores entre 1,4590 e 1,4670.

O óleo essencial das folhas secas de *E. elata* apresentou um índice de refração de 1,464, conforme mostrado na TABELA 4, estando dentro da média dos valores sugeridos por Guenther (1961) para óleos essenciais com finalidade medicinal, com valores de 1,4600 – 1,4700.

5.3.3 Solubilidade em etanol

Os resultados obtidos para a solubilidade em etanol do óleo essencial obtido a partir das folhas secas estão indicados na TABELA 5.

A determinação da solubilidade em etanol foi realizada de acordo com a Pharmacopea Helvética (1993), utilizando etanol 50, 60, 70, 80, 90% e etanol absoluto, sendo esta análise feita em triplicata.

TABELA 5 - SOLUBILIDADE EM ETANOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE *E. elata*.

Concentração do álcool	Média em mL gasto	Desvio Padrão	Resultado
Álcool 50%	2,2 mL	0,152753	1:22
Álcool 60%	0,3 mL	0	1:3
Álcool 70%	0,2 mL	0	1:2
Álcool 80%	0,1 mL	0	1:1
Álcool 90%	0,1 mL	0	1:1
Álcool 100%	0,1 mL	0	1:1

Valores expressos em média \pm desvio (n=3)

Desta forma o óleo essencial extraído de folhas de *E. elata*, apresentou-se completamente miscível em etanol 80% (v/v), 90% (v/v) e etanol absoluto, mostrando um decréscimo na solubilidade a medida que a concentração de etanol diminuiu, fato que pôde ser verificado quando o mesmo foi colocado em contato com a solução hidroalcoólica a 50%, sendo necessárias 22 vezes o volume de álcool em relação ao óleo essencial para solubilizá-lo completamente.

De acordo com a *International Standard Organization* (ISO), os óleos essenciais ricos em cineol devem apresentar solubilidade em etanol a 70% (v/v) de 1:3, enquanto os óleos essenciais ricos em citronelal devem apresentar solubilidade de 1:2 (VITTI; BRITO, 2003).

Para Guenther (1961), óleos essenciais com atividades medicinais devem apresentar solubilidade na faixa de 2,2 – 11 volumes, quando solubilizados em etanol 70%.

5.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

5.4.1 Características organolépticas

Para os diferentes extratos foram determinadas as características organolépticas e a determinação do pH do extrato, através de papel indicador pH (MERCK), com escala de precisão de 0.5.

A observação da cor (visual), olfação para detectar o odor e o sabor estão representados na TABELA 6.

Desta forma foi possível verificar que o extrato que apresentou maior porcentagem de resíduo seco foi representada pelas folhas secas com 16,345% (m/m) de sólidos extraíveis em etanol a 70%, em seguida obteve-se o melhor rendimento para o caule com 8,554% (m/m) de sólidos extraíveis em etanol a 70% e, por fim as cascas do caule com o menor rendimento, apresentando 5,675% (m/m) de extraíveis em etanol a 70%.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS, CASCAS DO CAULE E CAULE DE *E. elata*.

Extrato	Cor	Odor	Sabor	pH	Resíduo Seco (m/m)
Folhas Secas	Verde escuro	Aromático	Adstringente	5,5	16,345%
Caule	Castanho claro	Aromático	Amadeirado	5,0	8,554%
Cascas do Caule	Castanho escuro	Aromático	Amadeirado	5,0	5,675%

5.4.2 Compostos bioativos

Os presentes ensaios fitoquímicos apresentaram como resultado a presença de importantes compostos do metabolismo secundário como o grupo dos flavonóides, leucoantocianidinas e esteróides e/ ou triterpenos.

O grupo de metabólitos esteróides e/ ou triterpenos corresponde a uma classe de substâncias complexas e que tem em suas estruturas básicas derivadas do esqualeno ($C_{30}H_{50}$), havendo assim a possibilidade de substituição nos grupos funcionais, o que confere a estes metabólitos uma grande diversidade estrutural (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Sua presença nos extratos de *E. elata* foi revelada pela reação denominada reação de Lieberman-

Burchard, que se apresenta positiva quando há o desenvolvimento de coloração rosa, verde, azul ou amarelo (FALKENGBERG; SANTOS; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os flavonóides encontrados na análise representam uma importante classe de polifenóis, sendo estes encontrados em abundância no reino vegetal e apresentam estruturas bem distintas entre si. A prospecção dos flavonóides foi realizada utilizando quatro reações cromáticas, que apresentam colorações diferentes de acordo com o núcleo, o número e a posição dos substituintes hidroxilados presentes na estrutura fundamental dos flavonóides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

A pesquisa de compostos bioativos vem sendo realizada por diversos autores como Boscardin (2009), Franco (2005), Malinowski (2010) e Antonio (2011), nos quais todos obtiveram a presença de flavonóides nos extratos hidroalcoólicos a 20%, provenientes das folhas secas de *E. benthamii*, *E. cinerea*, *E. globulus* ssp. *bicostata* e *E. badjensis* Beuzev. & Welch, respectivamente. Desta forma a presença de flavonóides em diferentes espécies de eucaliptos se dá de forma bastante freqüente, mostrando coerência entre os resultados obtidos nas já pesquisas realizadas e o obtido no presente estudo com *E. elata*.

A obtenção de resposta positiva para a análise de leucoantocianidinas está diretamente correlacionada com a presença também positiva de flavonóides, uma vez que as leucoantocianidinas pertencem a esta classe e fazem parte dos taninos condensados, apresentando coloração avermelhada quando aquecidos juntamente com substâncias ácidas (COSTA, 2002).

A detecção dos compostos bioativos nos extratos hidroalcoólicos das folhas secas, cascas do caule e caule de *E. elata* estão apresentadas na TABELA 7.

TABELA 7 - PESQUISA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE *E. elata*.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	Resultados		
	Folhas Secas	Caule	Cascas do Caule
Alcalóides:			
Reação de Mayer	Negativo	Negativo	Negativo
Reação de Bertrand	Negativo	Negativo	Negativo
Reativo de Bouchardat	Negativo	Negativo	Negativo
Reativo de Dragendorff	Negativo	Negativo	Negativo
Flavonóides:			
Reação de Shinoda	Positivo	Positivo	Positivo
Reação oxalo-bórica	Positivo	Positivo	Positivo
Reação de Pacheco	Positivo	Positivo	Positivo
Reação com Lentilha de Zinco	Positivo	Positivo	Positivo
Leucoantocianidinas	Positivo	Positivo	Positivo
Glicosídeos Antraquinônicos:			
Reação de Bornträger	Negativo	Negativo	Negativo
Antraquinonas livres	Negativo	Negativo	Negativo
Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo
Esteróides ou triterpenóides			
Reação de Liebermann-Buchard	Positivo	Positivo	Positivo
Ácidos voláteis	Negativo (pH: 6,0)	Negativo (pH: 7,0)	Negativo (pH: 7,0)
Ácidos fixos	Negativo	Negativo	Negativo

5.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS

5.5.1 Características Organolépticas

Para os diferentes extratos foram determinadas as características organolépticas e a determinação do pH do extrato, através de papel indicador pH (MERCK), com escala de precisão de 0.5.

A observação da cor (visual), olfação para detectar o odor e o sabor estão representados na TABELA 8.

A amostra que apresentou melhor rendimento na extração em água foi representada pelas folhas secas, com um rendimento de 9,345% (m/m) de sólidos secos, em seguida obteve-se um rendimento de 5,554% (m/m) de rendimento de sólidos para o caule e com o menor valor apresentaram-se as cascas do caule com o valor de sólidos de 2,675% (m/m).

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE DE *E. elata*.

Extrato	Cor	Odor	Sabor	pH	Resíduo Seco (m/m)
Folhas Secas	Castanho claro	Aromático	Adstringente	5,0	9,345%
Caule	Castanho	Amadeirado	Adstringente	5,0	5,554%
Cascas do Caule	Castanho escuro	Amadeirado	Adstringente	5,0	2,675%

5.5.2 Compostos bioativos

Os presentes ensaios fitoquímicos realizados nos extratos aquosos das folhas, caule e cascas do caule de *E. elata* apresentaram como resultado a presença de importantes compostos do metabolismo secundário como o grupo dos glicosídeos antociânicos, saponinas, ácidos fixos, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e aminogrupos, demonstrados na TABELA 9, sendo estes metabólitos já identificados em outras espécies de *Eucalyptus* (FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009; MALINOWSKI, 2010; ANTONIO, 2011).

A presença de taninos é comumente encontrada em representantes da família Myrtaceae, fato que ocorre de maneira bastante comum entre as diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* (FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009; MALINOWSKI, 2010; ANTONIO, 2011). Para a detecção destes compostos foram realizados ensaios de oxidação de taninos, precipitação por sal metálico, coloração e complexação de taninos com proteínas e alcalóides. O ensaio realizado com solução de gelatina a 2,5% apresentou-se não reativo em todos os extratos e, segundo Costa (2002), esta característica pode estar correlacionado com a concentração dos taninos hidrolisáveis e condensados, podendo estar mais concentrados em diferentes órgãos, como folha, raiz e casca, o que traria diferentes resultados para as análises dos extratos.

O reativo de Nessler é utilizado na identificação dos ácidos fixos de ponto de ebulição elevado, que possuem a capacidade de apresentar coloração marrom após a aplicação do reativo, por ser capazes de fixar a amônia (NAKASHIMA, 1993).

O ensaio para detecção de aminogrupos é revelado positivo na presença de coloração azul-violáceo, revelando a existência de aminoácidos e/ ou compostos destes derivados (NAKASHIMA, 1993).

Glicosídeos saponínicos são facilmente identificados quando dispersos em solução aquosa, pois quando os mesmos ao sofrerem agitação apresentam poder

formador de espuma, sendo esta abundante e persistente, estando inclusive estável na presença de ácidos minerais diluídos, o que as distingue dos sabões comuns. São compostos anfifílicos, ou seja, apresentam em sua estrutura uma parte polar e outra apolar, sendo a parte polar ou hidrofílica representada por um ou mais açúcares e a parte apolar ou hidrofóbica representada por esteróides ou terpenos policíclicos. Estes compostos possuem particular característica emulsificante, ou seja, quebram a tensão superficial entre a água e o óleo, formando assim emulsões e apresentando característica detergente. Glicosídeos saponínicos podem possuir ação hemolítica, agindo sobre membranas biológicas, como também podem formar complexos com esteróides desenvolvendo assim atividade antifúngica e hipocolesterolemia (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

TABELA 9 - PESQUISA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS, CAULE E CASCAS DO CAULE DE *E. elata*.

MATABÓLITOS SECUNDÁRIOS	Resultados		
	Folhas Secas	Caule	Cascas do Caule
Glicosídeos Antociânicos	Positivo	Positivo	Positivo
Glicosídeos Saponínicos	Positivo	Positivo	Positivo
Glicosídeos cianogênicos:			
Reação de Isopurpurato de Sódio	Negativo	Negativo	Negativo
Ácidos Voláteis	Negativo (pH: 6,0)	Negativo (pH: 7,0)	Negativo (pH: 7,0)
Ácidos Fixos	Negativo	Positivo	Negativo
Taninos:			
Reação de cloreto férrico	Positivo	Positivo	Positivo
Reação com sulfato de ferro amoniacal	Positivo	Positivo	Positivo
Reação com gelatina 2,5%	Negativo	Negativo	Negativo
Reação com cloridrato de emetina	Positivo	Positivo	Positivo
Reação com cianeto de potássio	Positivo	Positivo	Positivo
Reação de Staniusny:			
Taninos Hidrolisáveis	Positivo	Positivo	Positivo
Taninos Condensados	Positivo	Positivo	Positivo
Aminogrupos	Positivo	Positivo	Positivo

5.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para a realização destas atividades foram selecionadas como amostras as frações provenientes das folhas secas (aquosa, butanol, acetato de etila, diclorometano e *n*-hexano), bem como as provenientes do caule (aquosa, butanol, acetato de etila, diclorometano e *n*-hexano) e por fim das cascas do caule (aquosa,

butanol, acetato de etila, diclorometano e *n*-hexano) e o óleo essencial das folhas secas.

5.6.1 Rendimento das frações

Os rendimentos de cada fração das folhas, caule e das cascas do caule estão representados na TABELA 10.

A fração hexânica das folhas secas, caule e cascas do caule apresentaram o menor rendimento, com o rendimento de 0,1223%, 0,2591% e 0,3990% respectivamente, desta forma pôde-se observar que o cascas do caule possuem maior concentração de compostos apolares, sendo assim extraíveis em *n*-hexano do que as demais partes da planta.

Enquanto que a fração diclorometano evidenciou o maior rendimento para todas as partes da planta, principalmente nas folhas secas, fato que deve estar intimamente relacionado com a possibilidade de este solvente ser um excelente extrator de clorofila, composto presente em altas concentrações nesta parte da planta.

Estes valores podem ser explicados com base nas classes de metabólitos secundários que foram identificados neste órgão vegetal, como os compostos fenólicos, que apresentam uma alta polaridade devido à presença das hidroxilas fenólicas, portanto extraíveis com solventes mais hidrofílicos.

TABELA 10 - RENDIMENTO EM % (M/M MV) DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS SECAS, CAULE E DAS CASCAS DO CAULE DE *E. elata*

Fração	Folhas Secas (%)	Caule (%)	Cascas do Caule (%)
<i>n</i> -Hexano	0,1223	0,2591	0,3990
Diclorometano	9,8654	3,2928	3,2951
Acetato De Etila	3,2501	1,2570	1,9151
Butanol	1,5531	1,0125	0,9815
Hidroalcoólica Remanescente	21,7525	0,2509	0,7512

O melhor rendimento foi o obtido na fração hidroalcoólica, demonstrando que esta parte da planta deve apresentar altas concentrações de compostos hidrossolúveis, ou seja, com predominância polar, este dado também pode ser

explicado pela presença marcante de compostos fenólicos neste órgão vegetal, detectados na análise fitoquímica preliminar.

Os diferentes valores obtidos para o rendimento das demais frações das partes da planta podem ser explicados pela variabilidade de compostos produzidos pela mesma, e que são pertencentes ao seu metabolismo secundário (SANTOS, 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

5.6.2 Atividade antioxidante

5.6.2.1 Método do fosfomolibdênio

No presente ensaio, a capacidade antioxidante é analisada através redução do molibdênio VI a molibdênio V em pH ácido, que é evidenciada pela mudança de coloração do meio reacional arroxeadado para uma solução esverdeada, como mostra a FIGURA 16.

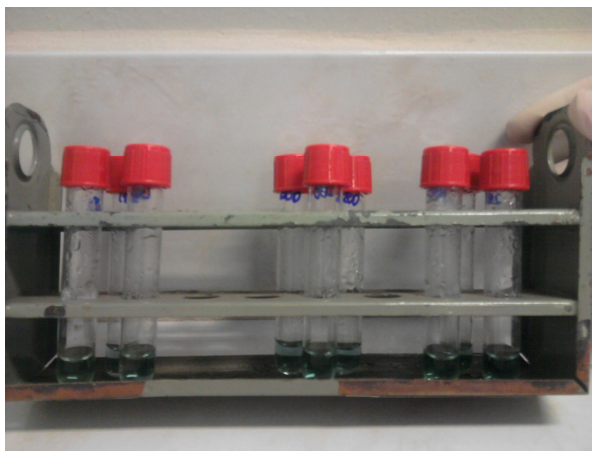


FIGURA 16 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS CONDIÇÕES REACIONAIS DO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.

Fonte: Autor (2012)

NOTA: Da esquerda para a direita, concentrações da solução de ácido ascórbico de 150, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$.

Para a avaliação e determinação da atividade antioxidante por esta metodologia foram utilizados os extratos brutos das folhas, caule e cascas do caule, bem como as frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica remanescente das partes citadas.

Para obtenção de uma equação linear simples e posteriormente a determinação da capacidade antioxidante total, foi necessária a construção de uma curva analítica, utilizando uma solução de ácido ascórbico, obtendo-se assim uma curva, mostrada no GRÁFICO 1. Esta curva por sua vez apresentou a seguinte equação, $Y = 0,0068X - 0,0388$, na qual a incógnita Y foi substituída pelos diferentes valores das médias das absorvâncias obtidas nas frações e extratos acima citados e o resultado da capacidade antioxidante destas amostras foi expresso em μg de ácido ascórbico/ g de material vegetal ($\mu\text{g AA/ g MV}$).

Os valores da capacidade antioxidante total obtido tanto para as amostras quanto para os padrões-referência nas diferentes concentrações estão expostos na TABELA 11.

GRÁFICO 1 – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO

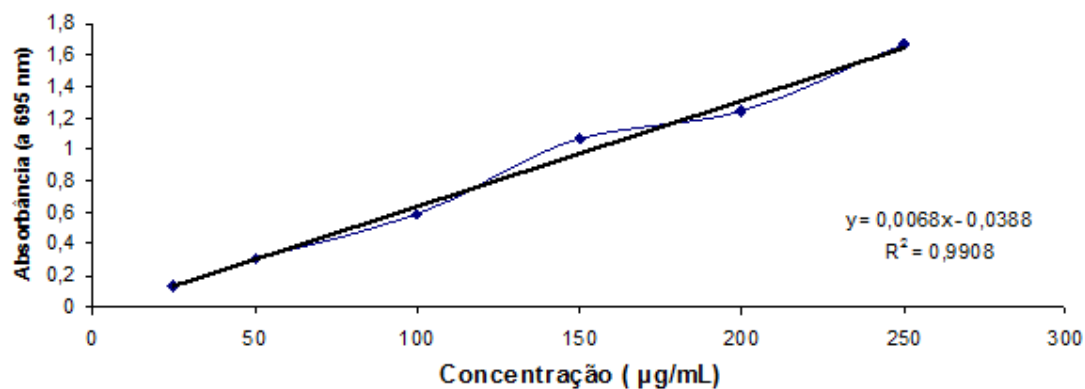


TABELA 11 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E DOS PADRÕES-REFERÊNCIA

AMOSTRA	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (mg AA/g MV) ± DP					
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
Extrato Bruto Folhas	30,22±0,01	32,21±0,02	53,28±0,04	84,19±0,14	111,9±0,02	115,03±0,04
Fração Acetato de Etila Folhas	16,27±0,01	17,29±0,01	32,50±0,01	33,28±0,01	43,15±0,01	54,45±0,01
Fração Butanol Folhas	20,08±0,01	28,58±0,01	50,74±0,04	62,37±0,02	78,76±0,04	102,18±0,02
Fração Hidroalcoólica Folhas	15,24±0,01	19,64±0,04	32,40±0,03	33,14±0,04	37,94±0,01	45,46±0,06
Extrato Bruto Casca	41,83±0,03	61,58±0,06	87,56±0,09	118,36±0,02	119,29±0,05	122,76±0,06
Fração Acetato de Etila Casca	34,91±0,02	64,53±0,01	82,12±0,04	110,44±0,01	123,64±0,01	129,99±0,03
Fração Butanol Casca	19,49±0,01	32,50±0,03	51,27±0,05	58,47±0,05	73,43±0,02	103,63±0,03
Fração Hidroalcoólica Casca	21,55±0,01	32,26±0,01	43,51±0,03	69,37±0,05	95,48±0,02	109,85±0,02
Extrato Bruto Caule	28,88±0,01	64,09±0,03	68,49±0,04	110,14±0,03	120,12±0,09	151,06±0,04
Fração Acetato de Etila Caule	16,12±0,01	22,13±0,01	31,38±0,01	47,70±0,05	52,39±0,03	63,94±0,03
Fração Butanol Caule	20,08±0,01	28,15±0,01	50,74±0,05	62,33±0,03	78,76±0,04	102,23±0,02
Fração Hidroalcoólica Caule	15,24±0,01	19,64±0,04	32,4±0,03	33,14±0,04	38,79±0,01	45,51±0,06
Rutina	24,53± 0,02	24,63±0,01	31,44±0,03	53,35±0,05	62,7±0,03	79,78±0,03
Ácido Gálico	50,88±0,01	88,29±0,02	143,89±0,01	169,85±0,14	182,17±0,03	208,43±0,10

O presente ensaio mostrou que os resultados obtidos para a capacidade antioxidante total são dose-dependentes, tanto para as amostras, quanto para os padrões de referência, ou seja, quanto maior a concentração da amostra testada, maior foi o resultado obtido para sua capacidade antioxidante, obtendo desta forma os valores máximos para a atividade na concentração de 250 µg/ mL em todas as amostras analisadas.

Para realizar a análise estatística da capacidade antioxidante total foram utilizados apenas os melhores valores obtidos no ensaio, sendo estes encontrados na concentração de 250 µg/ mL em todas as amostras analisadas.

Conforme demonstrado na TABELA 12, o padrão-referência ácido gálico, um ácido fenólico presente na classe dos taninos hidrolisáveis com potente atividade antioxidante (BARBOSA, 2010), foi o que apresentou a melhor capacidade antioxidante total, pôde-se também analisar que todas as frações e o extrato bruto

provenientes das cascas do caule tiveram excelentes resultados, pois apresentaram atividade antioxidante superior ao padrão-referência rutina, o qual apresenta atividade antioxidante comprovada e se enquadra na mesma classe da quercetina, um flavonóide da classe dos flavonóis (FILHO, SILVA e BOVERIS, 2002), fato este que também ocorreu com o extrato bruto das cascas do caule e das folhas, os quais demonstraram atividades estatisticamente equivalentes. A fração butanol das cascas do caule também apresentou resultado significativo e, por fim as frações butanol das folhas e do caule também apresentaram resultados superiores ao da rutina e estatisticamente semelhantes entre eles.

A fração acetato de etila do caule foi a primeira a apresentar resultados inferiores ao do padrão-referência rutina, logo em seguida e relativamente semelhantes seguiu a fração acetato de etila das folhas e as frações hidroalcoólicas remanescentes das folhas e caule, com valores bastante próximos.

Os resultados acima citados apresentam extrema importância, visto que apresentaram atividade muito próxima e inclusive superior a padrões-referência utilizados na pesquisa de antioxidantes.

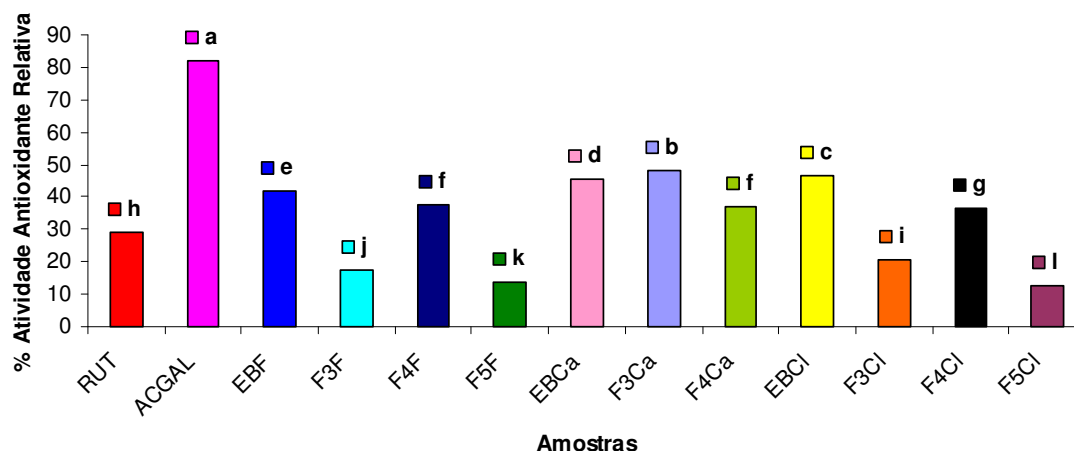
TABELA 12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS AMOSTRAS E PADRÕES PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

Tratamentos	Médias ($\mu\text{g AA/ g MV}$)	Teste de Tukey
Ácido gálico	207.713333	A
Fração acetato de etila cascas	129.136667	B
Extrato bruto caule	125.753333	b,c
Extrato bruto cascas	122.420000	b,c,d
Extrato bruto folhas	114.136667	b,c,d
Fração butanol cascas	102.713333	c,d
Fração butanol folhas	101.243333	D
Fração butanol caule	101.243333	D
Rutina	75.300000	F
Fração acetato de etila caule	62.960000	f,g
Fração acetato de etila folhas	53.400000	f,g
Fração hidroalcoólica folha	48.500000	G
Fração hidroalcoólica caule	44.430000	G

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

O GRÁFICO 2 mostra outro perfil de comparação entre as amostras e padrões-referência, considerando o ácido ascórbico como 100% de atividade antioxidante, obteve-se a porcentagem de atividade antioxidante relativa, também correlacionando com a concentração de 250 $\mu\text{g/ mL}$ e expressos nesta mesma concentração.

GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E PADRÕES EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO



Nota: F= Folhas; Ca= Cascas do caule e Cl= Caule

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Correlacionando os valores obtidos e considerando que a atividade do ácido ascórbico foi de 100%, verificou-se que o padrão de referência ácido gálico apresentou um valor bastante satisfatório com 82% de atividade antioxidante relativa. Na sequência apresentaram-se as frações acetato de etila das cascas do caule com 48%, o extrato bruto do caule com 46%, o extrato bruto das cascas do caule com 45%, o extrato bruto das folhas com 41% e com valores estatisticamente semelhantes à fração butanólica das folhas e a das cascas do caule com 37% e a fração butanólica do caule com 36%, sendo estes valores de grande importância, pois demonstrou atividade antioxidante relativa superior a do padrão referência rutina que obteve o resultado de 29% para esta análise. As demais frações acetato de etila do caule, acetato de etila das folhas, hidroalcoólica das folhas e hidroalcoólica do caule, obtiveram respectivamente os valores de 21%, 17%, 14% e 13%, demonstrando novamente atividade inferior a dos padrões de referência, sendo assim consideradas de baixa atividade antioxidante.

No presente experimento pôde-se observar que as frações das cascas do caule, bem como os extratos brutos das diferentes partes da planta foram as que mais apresentaram a atividade antioxidante, obtendo inclusive resultados superiores ao padrão-referência rutina.

Os resultados obtidos no experimento podem estar correlacionados com dois possíveis mecanismos de redução, pois esta metodologia permite detectar a capacidade antioxidante total de uma amostra, tanto para substâncias que possuem capacidade de doar um elétron ou um hidrogênio (mecanismo radicalar), sendo este composto com hidroxilas disponíveis, quanto para as substâncias que apresentam característica de doar um par de elétrons (mecanismo redox), sendo estes compostos caracterizados por possuírem anéis fenólicos contendo duplas ligações, podem provocando assim a redução do complexo do fosfomolibdênio (MALINOWSKI, 2010).

Sendo assim a amostra que mostrou o maior valor da capacidade antioxidante total e que provocou assim uma maior redução do complexo, foi o obtido na fração acetato de etila das cascas do caule, podendo estar correlacionado com a presença de compostos que interagem pelos dois mecanismos de redução, ou seja, radicalar e redox.

Nos estudos realizados por Antonio (2010) utilizando o *E. badjensis* as frações que apresentaram melhores resultados para esta atividade foram as provenientes das folhas desta espécie, apresentando 31,98% de atividade antioxidante na fração aquosa das folhas secas e, 38,26% na fração acetato de etila, 39,7% no óleo essencial das folhas secas, desta forma pôde-se concluir que o *E. elata* apresentou melhores resultados na atividade antioxidante quando comparado com o *E. badjensis*. Boscardin (2009) realizou o mesmo estudo com o óleo essencial extraído de folhas secas de *E. benthamii* e obteve o resultado de 43,15% de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico, entretanto Malinowski (2010) em seu estudo com o *E. globulus* ssp. *bicostata*, obteve nas mesmas condições experimentais, 25,72% de atividade para o óleo essencial das folhas secas, 23,27% para o extrato etanólico das folhas secas e 24,17% para o extrato hidroalcoólico das folhas secas (a 70%).

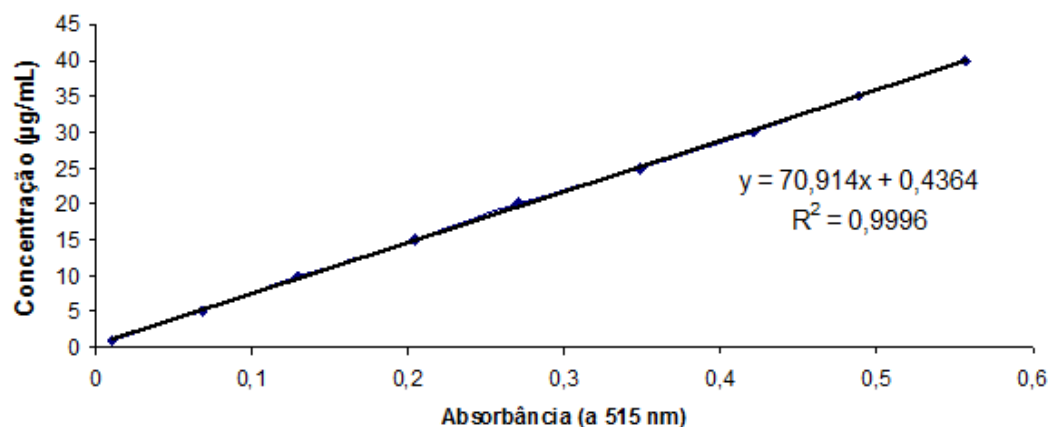
5.6.2.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

A solução de DPPH permitiu obter uma resposta linear frente a análise de regressão, representada no GRÁFICO 3, o qual apresentou a seguinte equação: $y = 70,91x + 0,5287$. A partir desta equação encontrou-se a concentração de DPPH

remanescente e, a partir deste valor calculou-se a porcentagem de DPPH remanescente em cada uma das concentrações de amostras das folhas, caule e cascas do caule, bem como nos padrões-referência ácido ascórbico, rutina e ácido gálico (TABELA 13).

A partir destes dados, foram realizadas curvas analíticas para calcular a porcentagem de atividade antioxidante nas diferentes amostras testadas frente ao radical DPPH, e os resultados para as mesmas encontram-se expostos nos gráficos de 4 a 17.

GRÁFICO 3 – CURVA ANALÍTICA DO DPPH



Através da análise das curvas analíticas obtidas nas diversas frações de diferentes partes da planta pôde-se verificar que as frações butanol e hidroalcoólica folhas (GRÁFICOS 6 e 7), o extrato bruto caule (GRÁFICO 11), bem como as frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica do caule (GRÁFICOS 12, 13 e 14) apresentaram o perfil de atividade antioxidante dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração das amostras, maior foi a resposta à atividade antioxidante.

Nos demais gráficos verificou-se a formação de um platô, podendo-se concluir que a partir de um determinado momento, mesmo que houvesse o aumento da concentração de amostra, não haveria proporcional aumento da atividade antioxidante. Este resultado indica que no momento em que a atividade antioxidante não aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração da amostra, obteve-se o máximo de atividade antioxidante que a amostra poderia desenvolver por meio da técnica de redução do radical livre DPPH.

Frente aos gráficos pôde-se evidenciar que todas as frações e o extrato bruto do caule apresentaram o mesmo modelo de atividade antioxidante, ou seja, dose-dependente em todas as concentrações analisadas.

Por outro lado as amostras das folhas e cascas do caule mostraram diferentes perfis, podendo-se, por exemplo, comparar o extrato bruto (GRÁFICO 4) e a fração acetato de etila (GRÁFICO 5) das folhas, os quais a partir das concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente, não apresentaram mais alterações em sua atividade antioxidante, chegando ao valor máximo desta atividade de $102,12 \pm 0,01\%$ e de $105,75 \pm 0,02\%$, na mesma seqüência. Já as frações butanol (GRÁFICO 6) e hidroalcoólica (GRÁFICO 7) das folhas apresentaram um aumento da atividade até a última concentração analisada (250 µg/mL), apresentando nesta última o valor máximo de atividade antioxidante, de $86,25 \pm 0,01\%$ e de $99,46 \pm 0,02\%$, respectivamente. Sendo assim pôde-se concluir que mesmo havendo um platô no gráfico da atividade antioxidante do extrato bruto e da fração acetato de etila das folhas, foram estas que apresentaram resultados mais expressivos, pois mesmo em menores concentrações apresentaram maiores valores para a atividade antioxidante.

TABELA 13 – PORCENTAGEM DE DPPH REMANESCENTE EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E PADRÕES DE REFERÊNCIA

AMOSTRA	%DPPH REMANESCENTE \pm DP					
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
Extrato Bruto Folhas	100,00 \pm 0,02	86,90 \pm 0,01	57,50 \pm 0,01	23,59 \pm 0,02	10,68 \pm 0,01	9,72 \pm 0,01
Fração Acetato de Etila Folhas	65,01 \pm 0,05	29,50 \pm 0,03	8,37 \pm 0,01	8,73 \pm 0,01	8,37 \pm 0,01	9,08 \pm 0,01
Fração Butanol Folhas	97,87 \pm 0,01	89,86 \pm 0,01	70,33 \pm 0,01	56,13 \pm 0,01	40,16 \pm 0,03	22,41 \pm 0,03
Fração Hidroalcoólica Folhas	77,62 \pm 0,01	65,01 \pm 0,01	39,44 \pm 0,01	19,38 \pm 0,01	12,99 \pm 0,01	8,37 \pm 0,01
Extrato Bruto Casca	100,00 \pm 0,03	62,80 \pm 0,02	14,47 \pm 0,01	11,69 \pm 0,01	11,69 \pm 0,01	11,66 \pm 0,01
Fração Acetato de Etila Casca	84,40 \pm 0,01	64,25 \pm 0,01	24,86 \pm 0,03	10,12 \pm 0,01	11,37 \pm 0,01	10,67 \pm 0,01
Fração Butanol Casca	100,00 \pm 0,02	78,26 \pm 0,01	35,26 \pm 0,01	13,31 \pm 0,01	9,18 \pm 0,01	9,28 \pm 0,01
Extrato Bruto Caule	100,00 \pm 0,01	89,98 \pm 0,02	59,22 \pm 0,02	26,38 \pm 0,01	12,68 \pm 0,02	8,60 \pm 0,01
Fração Acetato de Etila Caule	100,00 \pm 0,01	98,35 \pm 0,02	75,71 \pm 0,05	32,25 \pm 0,01	16,54 \pm 0,01	10,77 \pm 0,01
Fração Butanol Caule	85,82 \pm 0,02	70,05 \pm 0,01	51,73 \pm 0,01	18,90 \pm 0,01	11,73 \pm 0,01	9,08 \pm 0,01
Fração Hidroalcoólica Caule	100,00 \pm 0,06	96,37 \pm 0,04	65,98 \pm 0,01	25,22 \pm 0,02	13,32 \pm 0,01	9,52 \pm 0,01
Rutina	74,41 \pm 0,01	32,70 \pm 0,01	12,44 \pm 0,01	11,74 \pm 0,01	11,74 \pm 0,01	11,74 \pm 0,01
Ácido Gálico	11,39 \pm 0,01	10,87 \pm 0,01	10,67 \pm 0,01	10,50 \pm 0,01	10,50 \pm 0,01	10,14 \pm 0,01
Ácido Ascórbico	60,72 \pm 0,04	16,73 \pm 0,01	12,82 \pm 0,01	8,91 \pm 0,01	8,01 \pm 0,01	7,81 \pm 0,01

Frente aos padrões-referência verificou-se que tanto a rutina, quanto o ácido ascórbico e o ácido gálico apresentaram um platô, chegando assim no máximo de sua atividade antioxidante. Correlacionando os três padrões o que a amostra de ácido gálico (GRÁFICO 17) apresentou sua máxima atividade antioxidante na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a qual representou o valor de $106,28 \pm 0,04\%$ de atividade, em seguida a rutina (GRÁFICO 16) que na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma atividade de $105,3 \pm 0,15\%$ e por fim o ácido ascórbico (GRÁFICO 15) que na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ evidenciou o valor de atividade de $110,05 \pm 0,12\%$. Mostrando que o ácido gálico atingiu um platô em menor concentração quando comparado aos demais padrões-referência, entretanto o ácido ascórbico foi o padrão que apresentou a mais potente atividade antioxidante dentre os analisados.

GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

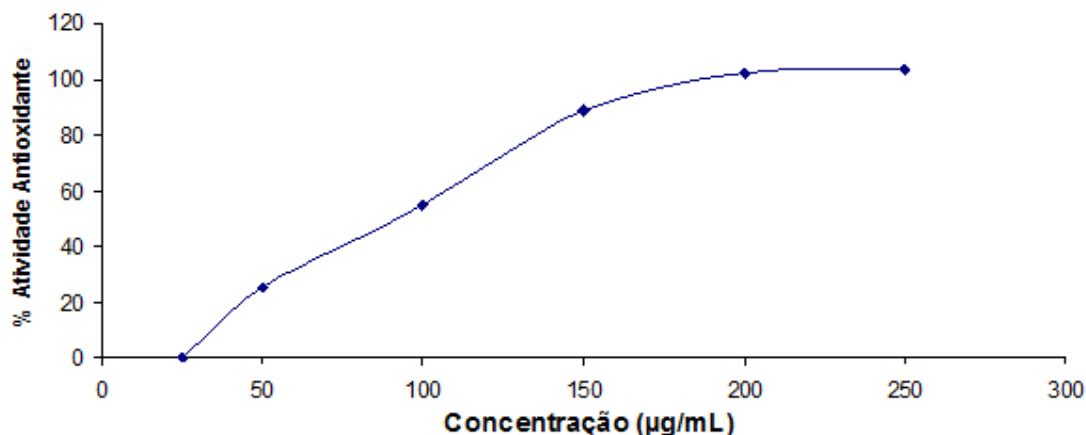


GRÁFICO 5 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

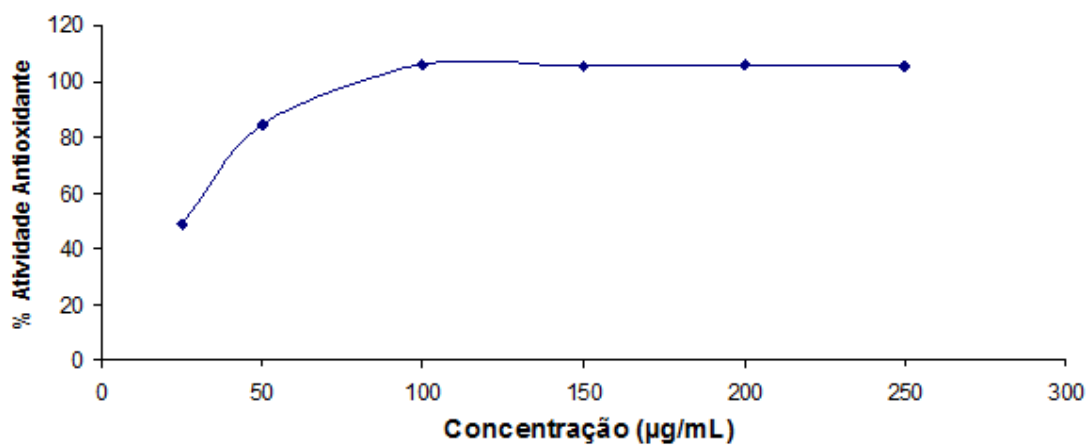


GRÁFICO 6 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO -BUTANOL DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

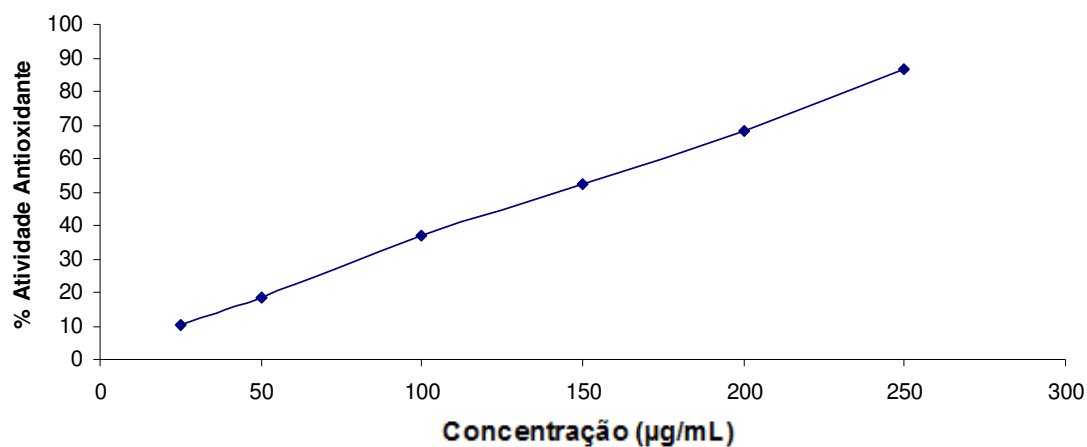


GRÁFICO 7 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

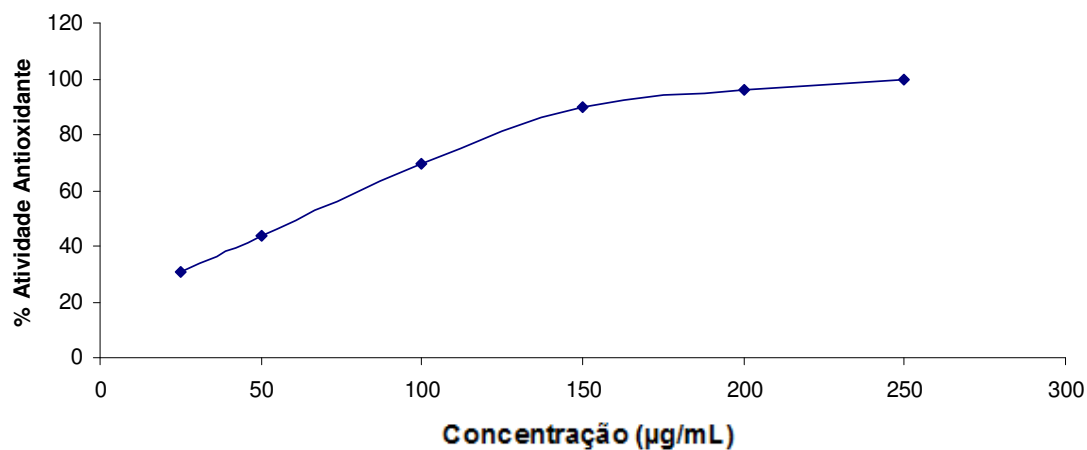


GRÁFICO 8 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH

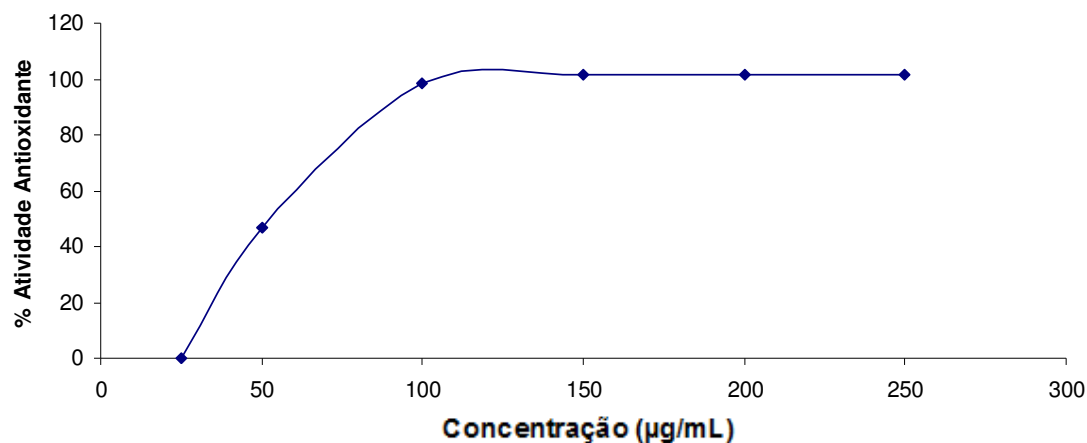


GRÁFICO 9 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH

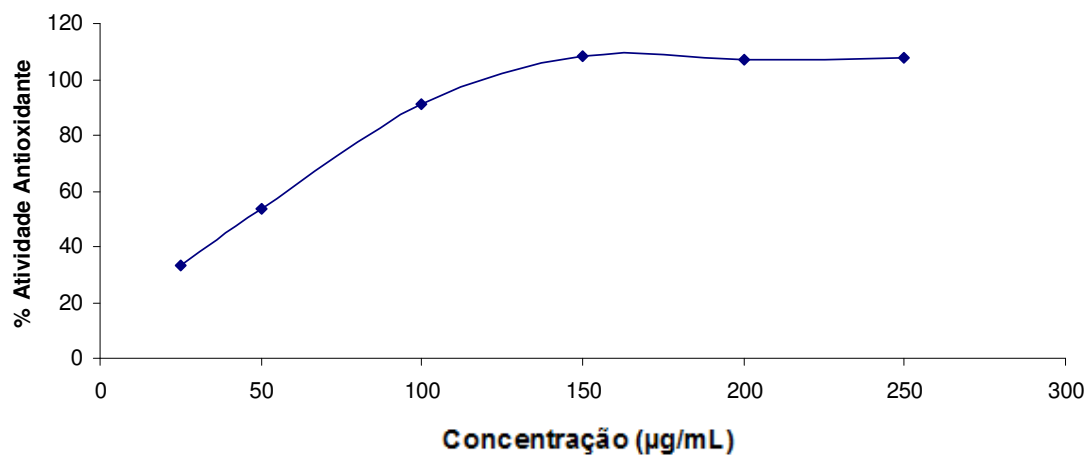


GRÁFICO 10 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS CASCAS, PELO MÉTODO DO DPPH

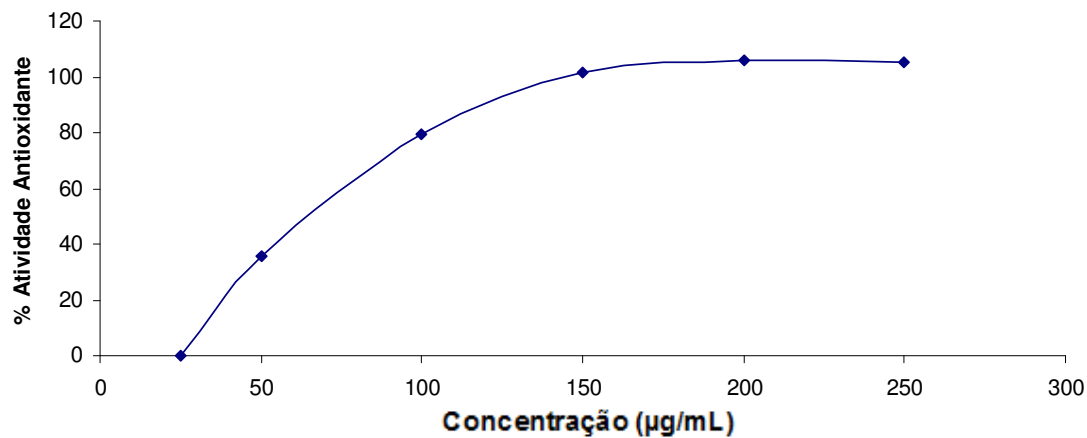


GRÁFICO 11 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

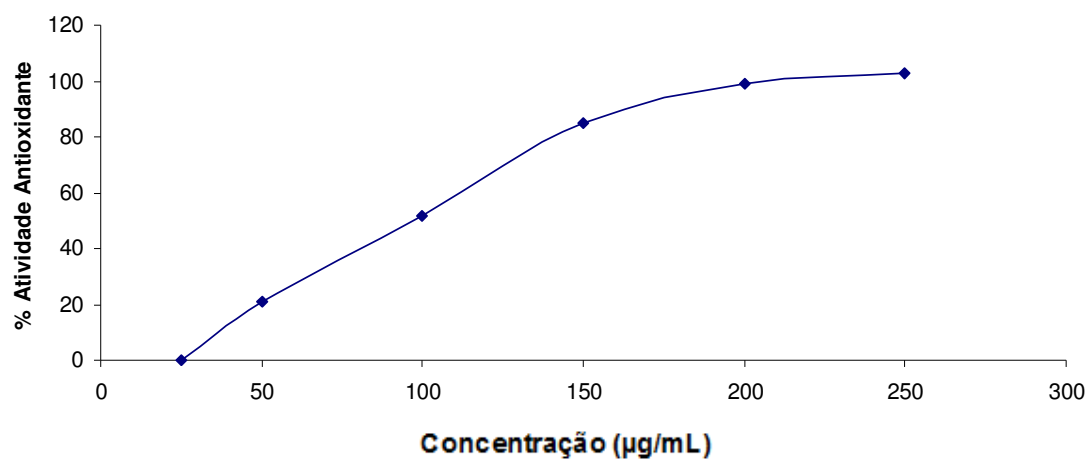


GRÁFICO 12 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

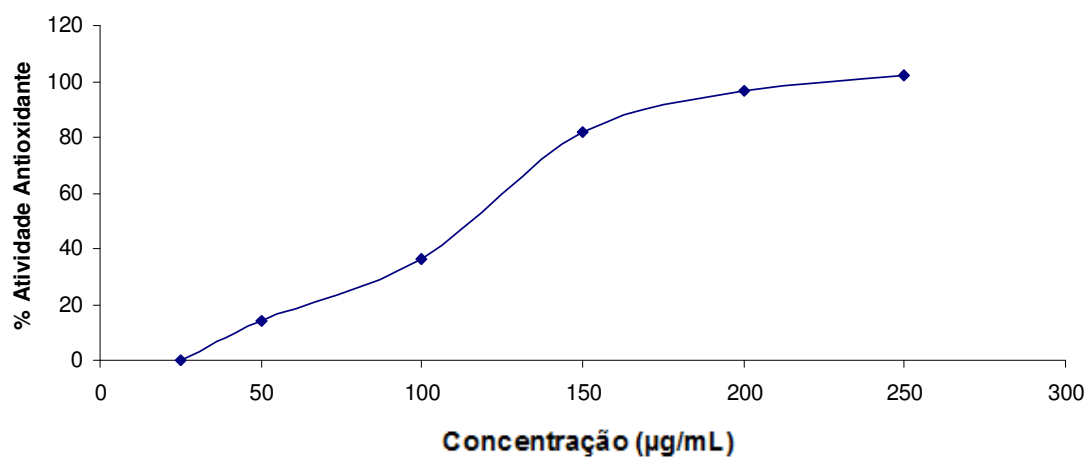


GRÁFICO 13 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

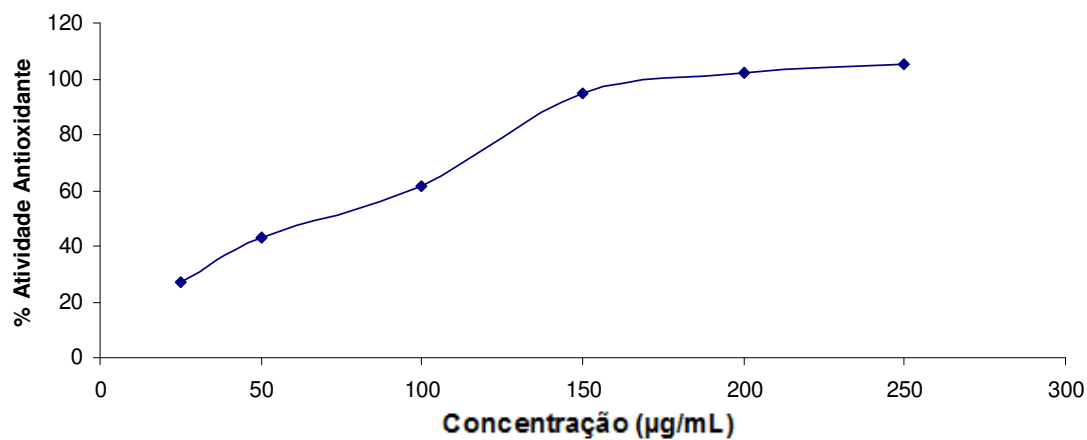


GRÁFICO 14 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

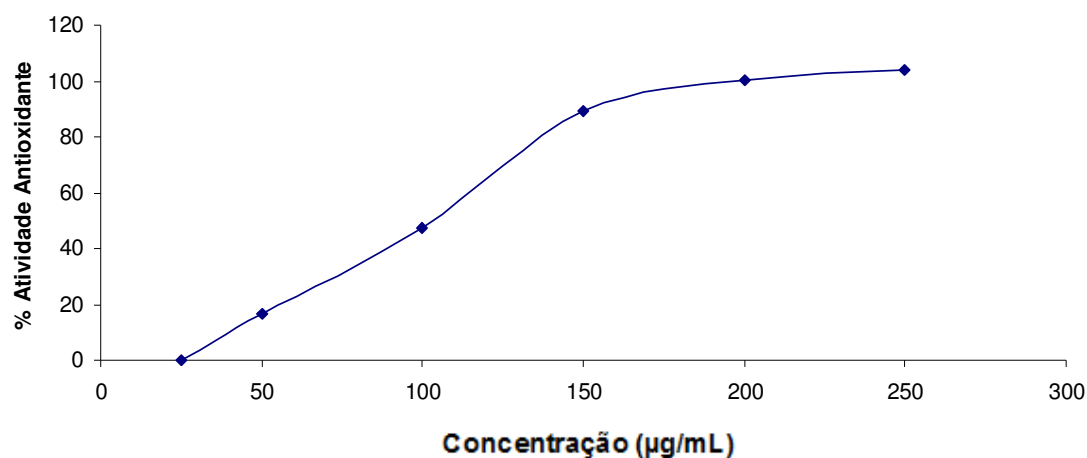


GRÁFICO 15 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DO DPPH

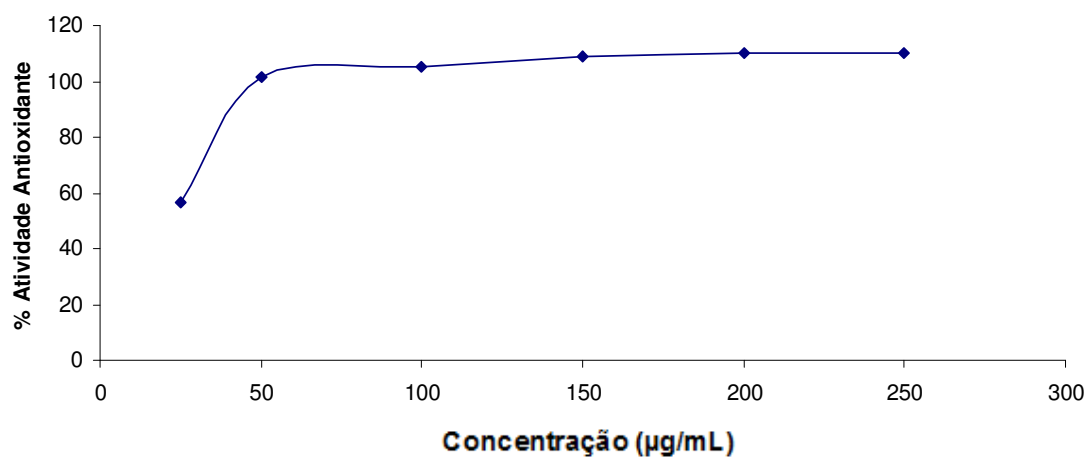


GRÁFICO 16 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE RUTINA, PELO MÉTODO DO DPPH

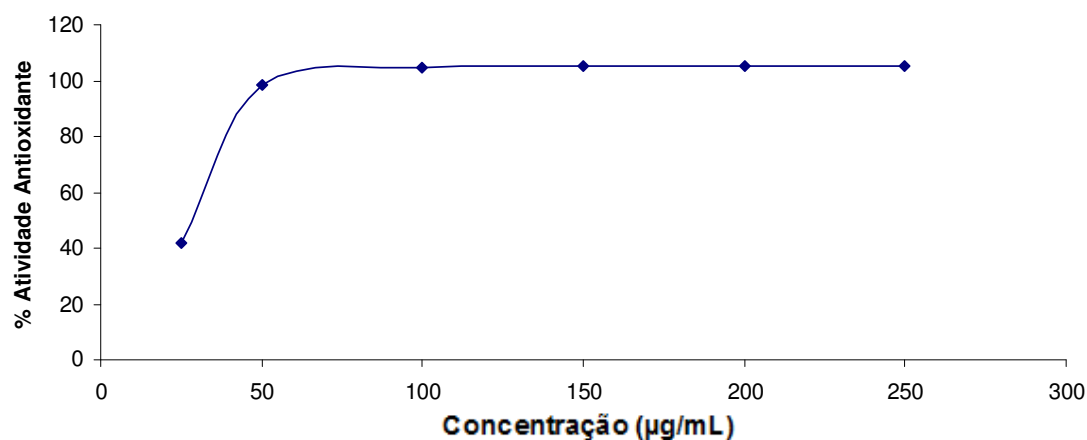
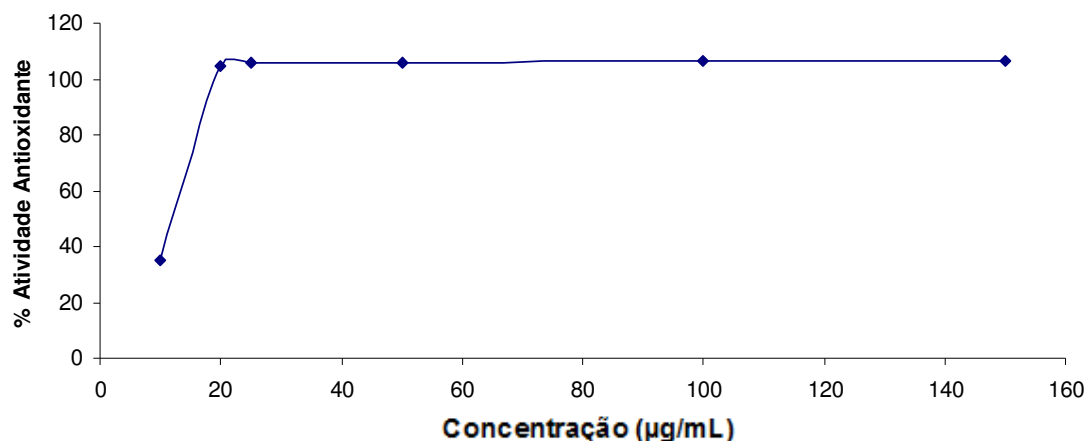


GRÁFICO 17 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO GÁLICO, PELO MÉTODO DO DPPH



As análises estatísticas das porcentagens das atividades antioxidantes das amostras e padrões-referência foram realizadas apenas na maior concentração de amostra, ou seja, 250 µg/mL, sendo estas realizadas pelo teste estatístico de Tukey, uma análise de variância que realiza comparação de médias, este teste permitiu a distinguir diferenças significativas mínimas dentre os resultados obtidos, bem como agrupar as amostras que apresentaram a mesma capacidade antioxidante e diferenciar das demais, determinando assim qual amostra apresentou a melhor atividade antioxidante pela metodologia empregada. O presente teste conseguiu analisar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) dentre as amostras testadas no referido ensaio e os padrões-referência, conforme demonstram os valores descritos na TABELA 13, a análise de variância ANOVA para o referido teste apresentou um coeficiente de variação de 2,56, sabe-se que para esta análise valores inferiores a 10 são considerados ótimos.

Segundo os resultados obtidos e demonstrados na TABELA 13 algumas frações apresentaram porcentagens de atividade muito boas, sendo inclusive melhores do que os próprios padrões-referência, conforme se pôde verificar na fração butanol das folhas, a qual apresentou o melhor valor de atividade antioxidante, sendo que na segunda menor concentração testada (50 µg/mL) já era perceptível a mudança de coloração no meio reacional demonstrando a redução na solução de DPPH, fato que pode ser observado na FIGURA 14.

A segunda melhor resposta à atividade foi obtida pelo extrato bruto das cascas do caule, a qual apresentou valores superiores ao padrão-referência ácido

ascórbico que ficou em terceiro lugar, em seguida obtiveram-se porcentagens próximas para as frações acetato de etila e butanol das cascas do caule e a fração butanol do caule apresentando assim resultados estatisticamente semelhantes ao do padrão ácido gálico.

A fração butanol das cascas do caule, a fração acetato de etila e o extrato bruto das folhas, bem como a fração butanol, hidroalcoólica e o extrato bruto do caule apresentaram atividade antioxidante estatisticamente semelhante ao padrão-referência rutina, o que demonstra uma importante atividade para estas frações.

TABELA 14 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E CONTROLES POSITIVOS PELO MÉTODO DO DPPH

Tratamentos	Médias	Teste de Tukey
Fração butanol folhas	113.466667	a
Extrato bruto cascas	110.316667	a, b
Ácido ascórbico	110.230000	a, b, c
Fração acetato de etila cascas	107.600000	a, b, c, d
Ácido gálico	106.760000	a, b, c, d
Fração butanol cascas	105.400000	b, c, d
Rutina	105.030000	b, c, d
Fração acetato de etila folha	105.030000	b, c, d
Fração butanol caule	105.010000	b, c, d
Fração hidroalcoólica caule	104.203333	b, c, d
Extrato bruto folhas	103.530000	b, c, d
Extrato bruto caule	102.946667	b, c, d
Fração acetato de etila caule	102.213333	c, d
Fração hidroalcoólica folha	101.793333	d

* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

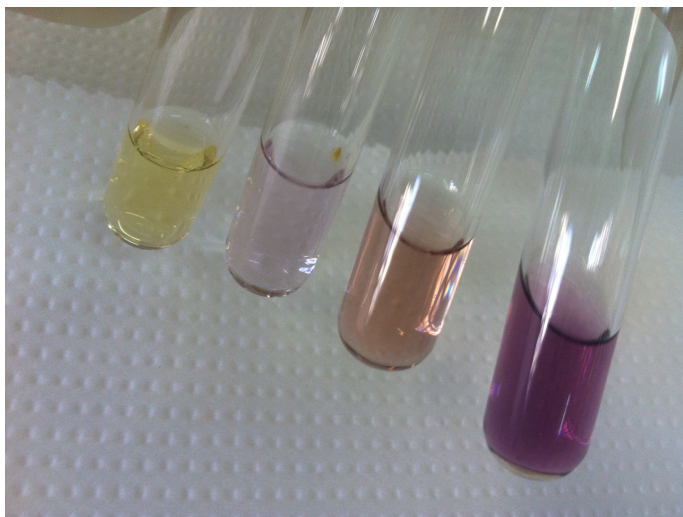


FIGURA 17 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE DPPH E FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS, APÓS O TEMPO REACIONAL.

Fonte: Autor (2012)

NOTA: Da direita para a esquerda, concentrações de 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ da fração butanol das folhas testadas neste ensaio, após adição da solução de DPPH, a coloração roxa mostra a solução de DPPH radical livre e o desenvolvimento de coloração amarela representa a redução deste radical livre.

Os resultados menos significativos para este teste foram obtidos nas frações acetato de etila caule e hidroalcoólica das folhas. Todos os resultados obtidos nesta análise foram considerados ótimos visto que apresentaram atividades antioxidantes estaticamente próximas aos padrões-referência, e inclusive algumas amostras como a fração butanol das folhas e o extrato bruto das cascas do caule, que apresentaram atividade superior aos padrões-referência testados já reconhecidos pela literatura.

Comparando os valores de capacidade antioxidante obtidos nos testes verificou-se novamente melhores resultados foram os obtidos nas amostras do caule e cascas do caule, se correlacionados com o extrato e frações das folhas, fato que pode estar diretamente ligado a metodologia utilizada, visto que este método avalia o poder redutor do antioxidante, não sendo portanto capaz de detectar substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Este fato também pode ocorrer pela maior presença de compostos poli-hidroxi-aromáticos nestas frações, visto que estes compostos apresentam maior capacidade de transferir elétrons para o radical livre DPPH do que substâncias que contenham anéis aromáticos ligados apenas a uma hidroxila, pela menor capacidade redox deste radical (BOSCARDIN, 2009).

Com os resultados obtidos para o cálculo do DPPH remanescente nas diferentes concentrações das amostras de extrato bruto e frações, bem como dos

padrões-referência, foi possível a construções de gráficos que apresentaram como resultado uma equação linear de primeiro grau. Para a determinação da concentração eficiente 50 (CE_{50}), ou seja, o valor necessário para reduzir a concentração do radical livre DPPH em 50% (TABELA 15), substituiu-se a incógnita y por 50 em todas as equações obtidas para cada uma das amostras e padrões.

As substâncias utilizadas como padrões-referência foram as que exibiram os menores valores de concentração eficiente, juntamente com a fração acetato de etila das folhas, sendo o ácido gálico o detentor da menor concentração, seguido pelo ácido ascórbico, pela fração acetato de etila das folhas e por fim pela rutina, sendo assim pode-se verificar que a fração acetato de etila das folhas apresentou uma atividade superior ao padrão-referência rutina, demonstrando uma excelente atividade antioxidante.

Outras quatro amostras analisadas por esta técnicas demonstraram valores de CE_{50} semelhantes aos encontrados para os padrões, sendo elas o extrato bruto das cascas do caule, a fração acetato de etila das cascas do caule, a fração hidroalcoólica das folhas e a fração butanol das cascas do caule, com um valor muito próximo ao obtido pelo padrão-referência rutina.

Entretanto, a fração butanol das folhas, que teve uma porcentagem de atividade antioxidante na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ equivalente a encontrada para o ácido ascórbico, necessita de uma concentração cerca de sete vezes maior do que este padrão-referência para conseguir reduzir a concentração inicial do DPPH em 50%. Um fato semelhante ocorreu com a fração hidroalcoólica das folhas que apresentou uma CE_{50} muito próximo ao padrão-referência rutina, porém foi a fração que apresentou a menor capacidade na análise da atividade antioxidante.

TABELA 15 – VALORES DAS CE₅₀ DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA PELO ENSAIO DO DPPH

AMOSTRA/ CONTROLE POSITIVO	CE₅₀ (µg/ mL)
Extrato bruto das folhas	109,48
Fração acetato de etila das folhas	36,14
Fração butanol das folhas	165,55
Fração hidroalcoólica das folhas	79,32
Extrato bruto das cascas	66,48
Fração acetato de etila das cascas	68,22
Fração butanol das cascas	82,88
Extrato bruto do caule	113,41
Fração acetato de etila do caule	128,39
Fração butanol do caule	101,79
Fração hidroalcoólica do caule	117,60
Ácido ascórbico	22,69
Rutina	45,08
Ácido gálico	15,50

As frações butanol, hidroalcoólica, acetato de etila e o extrato bruto provenientes do caule, bem como o extrato bruto das folhas exibiram um valor de CE₅₀ extremamente elevado, fato que foi diretamente relacionado com o seu perfil de menor capacidade atividade antioxidante, já apresentado em resultados anteriores.

O extrato bruto das cascas do caule, a fração acetato de etila das cascas do caule e o extrato bruto das mesmas demonstraram valores de CE₅₀ relativamente próximos quanto comparados entre si, fato também observado quando comparados aos padrões referência rutina, ácido ascórbico e ácido gálico, sendo que estes resultados foram diretamente proporcionais aos obtidos para a análise da capacidade antioxidante das mesmas amostras.

O extrato bruto e a fração acetato de etila das cascas do caule foram as amostras que obtiveram os valores mais lineares para percentual de atividade antioxidante e concentração eficiente, este fato pode estar associado ao fato destes solventes apresentarem uma polaridade que permite uma maior extração de compostos do tipo polifenóis, que possuem um perfil multifuncional na planta, pois podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Portanto, a ação antioxidante destes compostos pode ocorrer através de vários mecanismos, como o bloqueio, a interferência ou supressão das atividades das enzimas envolvidas na geração das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO, ERN), atuando como quelantes de metais em transição, tornando-os inativos, ou ainda, neutralizando os radicais livres, ou seja, deixando-os estáveis

(MOSQUERA, CORRERA, NIÑO, 2009). As características deste grupo de metabólitos secundários que podem ser encontrados nas plantas e, que foram detectados na análise fitoquímica desta espécie (especialmente nas duas frações relatadas acima), justificam a elevada capacidade antioxidante apresentada pela espécie em estudo.

Wang e colaboradores (2010) encontraram os seguintes valores de CE_{50} para as amostras preparadas a partir das folhas de *Liquidambar formosana*, no ensaio com DPPH: Extrato etanólico ($6,89 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$), extrato aquoso ($8,86 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$) e extrato acetônico ($12 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$). Todos os extratos tiveram valores de concentração eficiente menor do que o encontrado para o padrão BHT ($14,5 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$) também analisado neste experimento. Dentre os extratos avaliados, o extrato etanólico exibiu o melhor perfil de atividade antioxidante em todos os ensaios que foram realizados.

Diferenças foram encontradas nos resultados apresentados pelas amostras de *E. elata* e padrões-referência nas duas metodologias utilizadas. Isto prova que realmente existem mecanismos diversos e complexos, tanto para a inibição da oxidação, quanto para a neutralização dos radicais livres, por isto, os resultados de cada método não devem ser comparados entre si se o princípio da reação não for mesmo (MALINOWSKI, 2010).

As ERO's podem ser o principal fator envolvido em muitas doenças degenerativas, por este motivo, os antioxidantes podem apresentar efeitos preventivos e terapêuticos nestas enfermidades (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007). Em razão do grande interesse no uso de produtos naturais, também como antioxidantes na preservação de alimentos, estes resultados passam a ter significativa importância na determinação de efeitos benéficos para diferentes áreas. Sendo assim, o desenvolvimento comercial de plantas como novas fontes de antioxidantes para melhorar a saúde, podendo atuar na redução do desenvolvimento de doenças como a arteriosclerose, o diabetes, a hipertensão, doenças coronarianas e neurológicas degenerativas, redução da mutagenicidade e câncer, além de agir como conservante de alimentos, torna esta área de pesquisa muito valiosa nos dias de hoje (BARBOSA, 2010).

5.6.3 Atividade antimicrobiana

Com o aumento de infecções por micro-organismos resistentes à antibióticos, a busca por medicamentos inovadores e a pesquisa destinada a utilização de produtos naturais que sejam biosustentáveis e que possuam a capacidade de matar ou inibir a proliferação de fungos e bactérias se tornou essencial para a expansão da produção de novos agentes terapêuticos.

Desta forma o presente estudo teve como objetivo analisar tanto o óleo essencial, como os extratos brutos das folhas, caule e cascas do caule quanto a sua potência em relação à atividade antifúngica e/ ou antimicrobiana “*in vitro*” frente a diferentes cepas de micro-organismos patogênicos.

Como já descrito, a extração do óleo essencial foi realizada com a utilização do aparelho de Clevenger e as técnicas utilizadas para verificar a atividade foram as de difusão por meio sólido em cavidades e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), na qual foi realizada por microdiluição em caldo (NCCLS, M27–A2), determinando também se sua ação foi bactericida ou bacteriostática e/ ou fungicida ou fungistática.

Sabe-se que o óleo essencial de várias espécies de *Eucalyptus* tem demonstrado excelente atividade antimicrobiana, este fato pode estar correlacionado com a presença de polifenóis, como o grupo dos metabólitos secundários flavonóides e taninos, como também os esteróides e/ou triterpenos presentes nesta espécie e que apresentam atividade antimicrobiana (EVANS, 1996; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

De maneira geral os triterpenos podem induzir a perda da fluidez da membrana bacteriana, reduzindo assim sua mobilidade ou levando a ruptura desta, já os polifenóis possuem a capacidade de complexar a parede celular das bactérias, inibindo seu crescimento e proliferação, bem como alguns deles realizam esta ação por induzirem ao dano do DNA bacteriano (DALMARCO, 2009).

Segundo os estudos Dalmarco (2009), relata que a presença do ácido oleanólico pode provocar o rompimento da membrana celular bacteriana, apresentando desta forma a atividade antimicrobiana.

Diversos estudos para análise antimicrobiana e antifúngica já foram realizados com o óleo essencial proveniente das folhas secas de diferentes espécies

de *Eucalyptus*, desta forma podemos analisar que, em sua pesquisa Boscardin (2009), utilizando o óleo essencial de *E. benthamii*, concluiu que o mesmo apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e antifúngica à levedura *Candida albicans*. Malinowski (2010) em sua pesquisa utilizando o óleo essencial de *E. glóbulos ssp. bicostata*, pelo método de difusão em disco, evidenciou atividade antifúngica frente às leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* e *Malassezia pachydermatis*, sendo estas atividades foram atribuídas a sinergia dos terpenóides presentes.

Na pesquisa realizada por Antônio (2011) o óleo essencial de *E. badjensis* não apresentou atividade antimicrobiana e antifúngica relevante nas concentrações avaliadas frente às bactérias *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e à levedura *Candida albicans*.

A busca por novos medicamentos está focada em buscar mecanismo que minimizem o desenvolvimento de resistência às drogas já utilizadas, ao invés de serem produzidos antibióticos mais fortes, pode-se utilizar os óleos essenciais em sinergismo com medicamentos sintéticos, como ocorre nos casos de tratamentos para infecções superficiais e profundas causadas por *C. albicans* (HARRIS, 2002).

5.6.3.1 Teste de difusão em meio sólido a partir de cavidades

Foi realizada uma triagem utilizando o ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício para verificar uma avaliação inicial do potencial antimicrobiano dos extratos pesquisados, frente às oito cepas padrões de bactérias, sendo estas subdivididas em quatro Gram positivas e quatro Gram negativas.

Os resultados obtidos nesta análise não foram comparados diretamente com outros estudos, pois as diferenças obtidas no potencial antimicrobiano das amostras analisadas podem também estar correlacionadas com as propriedades físicas das mesmas, como solubilidade, volatilidade e a difusão no ágar (SCORZONI *et al.*, 2007), bem como o tempo de contato da amostra com o microrganismo e a qualidade de emulsificador (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Este ensaio se baseia na difusão radial do extrato, sendo assim, a possível presença de partículas em suspensão nas amostras a serem analisadas não

interferem na difusão da substância antimicrobiana no ágar, tornando este método mais apropriado para testar a difusão de extratos etanólicos de plantas (SILVEIRA *et al.*, 2009), desta forma, este recurso é empregado por vários autores no lugar do teste de difusão do extrato a partir de disco, apresentando melhores resultados (AYRES *et al.*, 2008).

Os testes realizados utilizando os extratos brutos das folhas, caule e cascas do caule não obtiverem resultado positivo, não havendo assim a formação de um halo de inibição, em contrapartida o óleo essencial apresentou resultados bastante relevantes, como pode ser observado na TABELA 16.

Para comprovação da relevância dos resultados, verificou-se que na sua menor concentração (1:16), o óleo essencial apresentou capacidade de inibição de crescimento bacteriano para todas as cepas testadas exceto para o *Proteus mirabilis* (TABELA 16), fato que também foi evidenciado com antibiótico padrão Vancomicina (TABELA 17).

Através de uma análise de variância, que foi realizada a partir dos valores de halo de inibição apresentados pelo óleo essencial em todas as concentrações, pôde-se verificar uma diferença significativa entre os resultados obtidos (TABELA 16). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, e a espécie *Bacillus subtilis* foi a que apresentou maior sensibilidade a ação antimicrobiana do óleo essencial de *E. elata*, o que pode ser confirmado pela presença do halo de inibição de maior diâmetro em todas as concentrações da amostra.

TABELA 16 – VALORES DE HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E PELO CONTROLE NEGATIVO*

Micro-organismos	(ZI mm)*					
	GRAM	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	DMSO
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	14 b	15 a	16 a	13 a	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	14 b	12 a	13 a	13 a	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	13 b	16 a	14 a	12 a	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	16 a, b	15 a	12 a	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	11 b	12 a	13 a	11 a	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	14 a, b	12 a	12 a	10 a	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	17 a, b	16 a	15 a	14 a	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	30 a	20 a	13 a	13 a	-

*Médias (n=3) seguidas de letras iguais, na mesma colina (amostra), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

** Valores das zonas de inibição expressos em mm, incluindo o diâmetro da cavidade de 8 mm; (-) se refere à valores de inibição nulos.

Os resultados obtidos para as cepas de bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, foram estatisticamente semelhantes em todas as concentrações, sendo que os mesmos apresentaram o segundo lugar em sensibilidade às bactérias, nas diferentes concentrações do óleo. A FIGURA 18 mostra a análise da atividade antimicrobiana por difusão em meio sólido com a bactéria *Enterobacter aerogenes* nas diferentes concentrações do óleo essencial e também frente ao controle negativo DMSO, mostrando a presença do halo de inibição, bastante delineado, do crescimento do microrganismo em questão.

Na sequência de resultados as cepas dos micro-organismos *Enterococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis* revelaram resultados positivos para a sensibilidade do óleo essencial em todas as suas concentrações, sendo que os mesmos apresentaram resultados significativamente semelhantes.

Por fim a cepa da bactéria *Proteus mirabilis* foi a que apresentou a menor sensibilidade às amostras do óleo nas diferentes concentrações, apresentando os menores resultados, e sendo inclusive resistente ao óleo essencial na concentração de 1:16, este micro-organismos não possui nenhuma outra espécie com resultados semelhantes estatisticamente na presente análise.

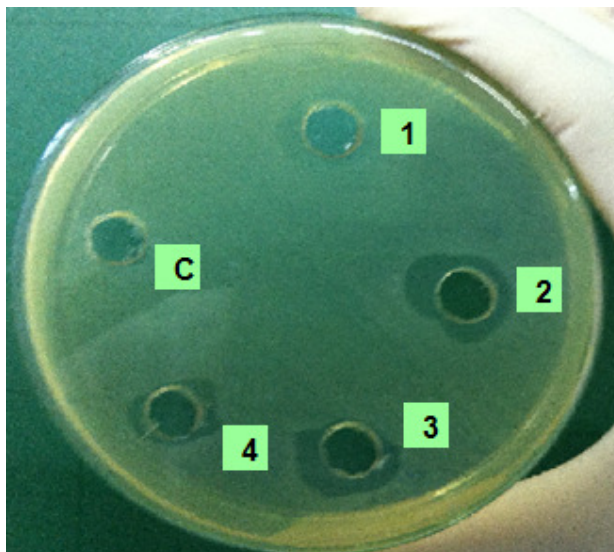


FIGURA 18 – PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. elata* FRENTE À BACTÉRIA *Enterobacter aerogenes*.

Fonte: Autor (2012)

NOTA: 1 = Óleo essencial (1:2); 2 = Óleo essencial (1:4); 3 = Óleo essencial (1:8); 4 = Óleo essencial (1:16); C = Controle negativo (DMSO).

Com os resultados obtidos na análise dos padrões de antibióticos frente às cepas de bactérias selecionadas, observou-se que apenas a Eritromicina, a Gentamicina e a Tetraciclina apresentaram atividade inibitória frente à todas as cepas de micro-organismos testados.

Através da análise de variância, que foi realizada a partir dos valores de halo de inibição apresentados pelo óleo essencial em todas as concentrações, pôde-se verificar uma diferença significativa entre os resultados obtidos para as diferentes bactérias frente aos antibióticos padrão (TABELA 17). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, e a espécie *Staphylococcus aureus* foi a cepa que apresentou, de maneira geral, maior sensibilidade a ação dos diferentes antimicrobianos, o que pode ser confirmado pela presença do halo de inibição de maior diâmetro frente à todas as amostras, seguida pelo *Bacillus subtilis*.

Frente aos antibióticos Ampicilina, Eritromicina, Penicilina e Tetraciclina a cepa que demonstrou maior sensibilidade foi o *Staphylococcus aureus*, porém a Eritromicina apresentou excelente atividade antimicrobiana para a bactéria *Staphylococcus aureus*, bem como para o *Bacillus Subtilis*, com resultados estatisticamente semelhantes. Por fim os antibióticos Gentamicina e Vancomicina

demonstraram maior sensibilidade frente ao *Bacillus subtilis*. Mostrando que estas duas cepas de bactérias são as mais sensíveis à atividade antimicrobiana dos padrões utilizados.

A utilização inadequada de antibióticos, desde a prescrição inadequada até a utilização de forma indevida está intimamente relacionada com o aumento do desenvolvimento de resistência das bactérias aos antibióticos utilizados na terapia convencional, isso se deve a capacidade que certos micro-organismos apresentam em desenvolver mutações origina a capacidade que os mesmos apresentam em originar resistência a certos antibióticos, perpetuando assim esta resistência na suas próximas gerações da mesma espécie, dificultando assim a eficácia do tratamento e aumentando a pressão eletiva desenvolvida pelos micro-organismos frente aos antibióticos (LIMA, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010).

TABELA 17 – VALORES DE HALOS DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PADRÕES

<i>Micro-organismos</i>	G R A M	(ZI mm)*					
		AMP 10 µg	ERI 15 µg	GEN 10 µg	PEN 10 µg	TET 30 µg	VAN 30 µg
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	20 b, c	14,3±0,6 b	17,3±2,5 b, c	13,3±1,5 d	19,7±0,6 c	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	15,3±0,6 c	19±1 b	17±3 b, c	9±1 e	24±1 b, c	8,7±1,5 b
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	12,3±2,1 b	15,3±0,6 c	-	20 c	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	21,7±1,5 b	7,3±6,4 b	18±2 b, c	19±1 c	10,3±0,6 d	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	42,3±2,1 a	33,3±2,9 a	22,3±0,6 a, b	37,7±2,5 a	32±1 a	18,7±0,6 b
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	-	16,3±2,1 b	19,7±1,1 b, c	-	24,3±1,1 b, c	7,3±6,4 b
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	-	12 b	20 b, c	-	20 c	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	25,5±3,5 b	29±8,2 a	26±3,6 a	24 b	27,7±6,8 a, b	19,7±2,5 a

*Valores de zona de inibição expressos em mm, incluindo o diâmetro do disco de 6 mm; (-) se refere à valores de inibição nulos.

Para realizar a comparação entre os resultados obtidos utilizando os discos de antibióticos que continham um diâmetro de 6 mm e a cavidade impregnada com óleo essencial que possuía um diâmetro de 8 mm, foi realizada a mensuração apenas da região de inibição, ou seja, mensurou-se a diferença entre a borda da

cavidade ou disco até o início do crescimento de micro-organismos. Desta forma, independente do diâmetro da cavidade ou dos discos, foi levada em consideração apenas a área de inibição de crescimento dos micro-organismos, possibilitando a análise estatística destes valores.

O óleo essencial de *E. elata* apresentou inibição de crescimento tanto para as bactérias Gram negativas, quanto para as Gram positivas, demonstrando grande aplicabilidade no tratamento das mais diversas patologias associadas à estas bactérias. A TABELA 18 apresenta dados que correlacionam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente as bactérias, bem como a ação dos antibióticos padrões e, a partir dela pode-se verificar que em algumas concentrações o óleo essencial apresentaram inclusive atividade superior aos antibióticos convencionalmente comercializados, mostrando a importância e relevância da pesquisa em questão.

Inicialmente foram avaliadas as bactérias Gram negativas, sendo assim a *Salmonella typhimurium* foi a que apresentou maior sensibilidade frente ao padrão-referência Ampicilina, em seguida, com resultados significativamente semelhantes, encontram-se a Eritromicina, Gentamicina e o óleo essencial nas diluições de (1:2), (1:4) e (1:6), considerando-se estes dados muito importantes, pois houveram resultados positivos inclusive para amostras do óleo bastante diluídas, sendo estes equivalentes aos obtidos para alguns dos antibióticos-padrões.

Frente a bactérias *Escherichia coli* o melhor resultado foi apresentado pela Tetraciclina, seguido da Ampicilina, apresentando menor atividade para as outras amostras antimicrobianas, porém ainda relevantes, pois mesmo na menor concentração do óleo essencial (1:16) ele conseguiu desenvolver sensibilidade ao microrganismo em questão.

Em relação ao *Enterobacter aerogenes* o óleo essencial na diluição de (1:4) foi a amostra que apresentou o melhor resultado, seguida do antibiótico Tetraciclina e do óleo essencial na concentração (1:8) que apresentaram resultados significativamente semelhantes. Os resultados obtidos para a análise do microrganismo *Proteus mirabilis* foi superior frente aos antibióticos Penicilina e Ampicilina, seguidos da Gentamicina e do óleo essencial nas diluições de (1:2) e (1:4) com resultados estatisticamente semelhantes, sendo que esta bactéria foi sensível a todos os antibióticos utilizados na análise e resistente apenas ao óleo essencial na sua maior diluição (1:16).

TABELA 18 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS ANTIBIÓTICOS PADRÕES POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO/CAVIDADE E O CRESCIMENTO BACTERIANO*

Micro-organismos	(ZI mm)*									
	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	AMP 10 µg	ERI 15 µg	GEN 10 µg	PEN 10 µg	TET 30 µg	VAN 30 µg
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	14 a, b, c	15 a, b, c	16 a, b, c	13 c	14 a	8,33 a, b, c	11,33 a, b, c	7,33 b, c	13,67 a, b	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14 c, d	13 d, e	13 d	13 d, e	9,33 b, c, d	13 b	11 b, c	30 e, f	18 a	27 f
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	13 b	16 a	14 a, b	12 b	-	6,33 b	9,33 b	-	14 a, b	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	16 a, b, c	15 a, b, c	12 b, c	-	16 a	4,67 c	12 a, b	13 a	4,33 c	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11 e	12 e	13 e	11 e	36 a	27 b, c	16 d	32 a, b	26 c	13 d
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	14 c, d	12 d	12 c, d	10 d	-	10,3 b, c	13,7 b	-	18,3 a	13 d
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	17 a, b	16 a, b	15 a, b	14 a, b	-	6 b	14 a	-	14 a	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30 a	20 a, b	13 b	13 b	18,67 a	23 a	20 a	18 a	22 a	14 a, b

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha (espécie de bactérias), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**Valores das regiões de inibição expressos em milímetros (mm); (-) se refere à valores de inibição nulos.

No tocante das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* apresentou maior sensibilidade ao antibiótico Ampicilina, seguida da Penicilina e a menor sensibilidade foi a obtida para o óleo essencial que em todas as concentrações, não apresentou diferença significativa entre as diluições testadas. A cepa de *Enterococcus faecalis* apresentou melhores resultados frente a Tetraciclina, bem como também apresentou sensibilidade a todas as diluições do óleo essencial, porém em menor relevância.

Na análise das cepas de *Streptococcus pyogenes*, foi observada melhor sensibilidade aos antibióticos Tetraciclina e Gentamicina, seguido do óleo essencial nas diferentes concentrações, neste caso, pôde-se observar que o óleo essencial apresentou atividade superior inclusive aos antibióticos padrões Ampicilina,

Penicilina e Vancomicina, os quais não apresentaram atividade antimicrobiana para esta bactéria.

O micro-organismo *Bacillus subtilis* foi o que apresentou maior sensibilidade, tanto aos antibióticos padrões quanto as diferentes diluições do óleo essencial, apresentando resultados significativamente semelhantes para Ampicilina, Eritromicina, Gentamicina, Penicilina, Tetraciclina e ao óleo essencial na sua menor diluição (1:2).

De posse dos resultados obtidos nesta análise (TABELA 18) pôde-se concluir que o óleo essencial de *E. elata* apresenta atividade antimicrobiana muitas vezes semelhante ou ainda melhor que alguns antibióticos padrões utilizados convencionalmente no mercado nacional. Apresentando resultados positivos tanto para as bactérias Gram positivas, que restringem a ação de componentes hidrofóbicos do óleo essencial com a bicamada fosfolipídica da membrana celular, aonde os mesmo realizam sua atividade, quanto para as Gram negativas as quais são constituídas por múltiplas camadas, bastante complexas, apresentando sua parede celular compostas de peptidoglicanos e três outros componentes que a envolvem externamente, sendo estas as lipoproteínas, a membrana externa e os lipopolissacarídeos (HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010).

Todos os resultados obtidos nesta análise do óleo essencial frente à diversos micro-organismos são de extrema valia, pois a única amostra que não apresentou atividade antimicrobiana foi o óleo essencial na diluição sua maior diluição (1:16) para a cepa de *Proteus mirabilis*, para todos os outros micro-organismos analisados obteve-se resposta positiva a sensibilidade das cepas, inclusive nas menores concentrações avaliadas.

Na seqüência foi realizada a mesma análise para verificar a atividade antifúngica dos extratos das folhas, caule, cascas do caule e ao óleo essencial de *E. elata*, frente às leveduras *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Trichosporon beigelli*.

Novamente os extratos da folha, do caule e das cascas do caule não apresentaram atividade para nenhuma das leveduras utilizadas nesta análise, em contrapartida o óleo essencial apresentou atividade para quase todas as leveduras analisadas, obtendo resultados negativos apenas frente à levedura *Trichosporon beigelli* (TABELA 19).

As leveduras *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* apresentaram sensibilidade ao óleo essencial nas diluições (1:2), (1:4), (1:8), obtendo para as mesmas diluições resultados estatisticamente semelhantes. A *Candida albicans* foi a única levedura que apresentou sensibilidade ao óleo essencial na sua maior diluição (1:16). E por fim a levedura *Candida krusei* demonstrou sensibilidade ao óleo essencial apenas na sua menor diluição (1:2), sendo que este resultado foi considerado estatisticamente semelhante aos obtidos para as outras leveduras analisadas e sensíveis ao óleo.

A análise do controle negativo demonstrou resultado negativo à sensibilidade das leveduras, ou seja, não apresentou halo de inibição, mostrando que não há interferência do solvente utilizado para a diluição do óleo essencial nas diferentes concentrações com os resultados obtidos para a ação antifúngica do óleo essencial.

TABELA 19 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E CONTROLE NEGATIVO*

Micro-organismos	(ZI mm)*				
	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	Tween 80 à 10%
<i>Candida glabrata</i>	14 a	13 a	14 a	-	-
<i>Candida albicans</i>	39 a	19 a	17 a	12	-
<i>Candida tropicalis</i>	33,3 a	13 a	12,5 a	-	-
<i>Candida krusei</i>	18 a	-	-	-	-
<i>Trichosporon beigelli</i>	-	-	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha (espécie de leveduras), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**Valores das regiões de inibição expressos em milímetros (mm), incluindo o diâmetro da cavidade de 8mm; (-) se refere à valores de inibição nulos; (n) se refere à amostras não testadas.

Através da análise de variância, que foi realizada a partir dos valores de halo de inibição apresentados pelo óleo essencial em todas as concentrações e dos controles positivos Cetoconazol e Terbinafina, pôde-se verificar uma diferença significativa entre os resultados obtidos para as diferentes leveduras (TABELA 20). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, e a espécie *Trichosporon beigelli* foi a única levedura que não apresentou sensibilidade a ação dos controles positivos e a nenhuma das diluições do óleo essencial e todas as leveduras analisadas apresentaram maior sensibilidade antifúngica de referência cetoconazol.

Foi selecionado o Cetoconazol e a Terbinafina como padrões de referência, pois são os mais utilizados e principais representantes que agem inibindo a síntese do ergosterol, porém apesar de apresentarem uma atividade antifúngica bastante válida, apresentam também significativos efeitos adversos ao homem, sendo muitas vezes considerados tóxicos para o organismo humano, visto que inibem algumas etapas da síntese do colesterol e assim algumas vias sintéticas que sintetizam os hormônios sexuais, dentre outros esteróides, além de poderem apresentar importante efeito hepatotóxico (ZACCHINO, 2002).

A levedura *Candida glabrata* apresentou o melhor resultado frente ao controle positivo Cetoconazol, seguido da Terbinafina (FIGURA 19) e do óleo essencial na concentração (1:2), mostrando resultado negativo apenas para o óleo essencial na sua menor concentração (1:16).

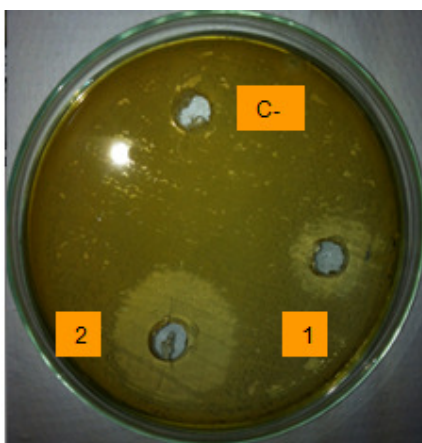


FIGURA 19 – PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DOS PADRÕES-REFERÊNCIA FRENTE À LEVEDURA *Candida glabrata*.

Fonte: Autor (2012)

NOTA: 1 = Orifício contendo solução de terbinafina 50µg/ 20µL; 2 = Orifício contendo solução de cetoconazol 50µg/ 20µL; C - = Orifício contendo controle negativo (solução de tween 80 à 10%).

A levedura *Candida albicans* também apresentou melhor sensibilidade frente ao padrão Cetoconazol, porém apresentou atividades estatisticamente semelhantes frente ao controle positivo Terbinafina e as diluições do óleo essencial (1:2), (1:4) e (1:8). Todas as concentrações do óleo essencial de *E. elata* apresentaram resultado positivo para a levedura *Candida albicans*, fato que pode ser confirmado pela

presença do halo de inibição frente a todas as diluições do óleo essencial como mostra a FIGURA 20.

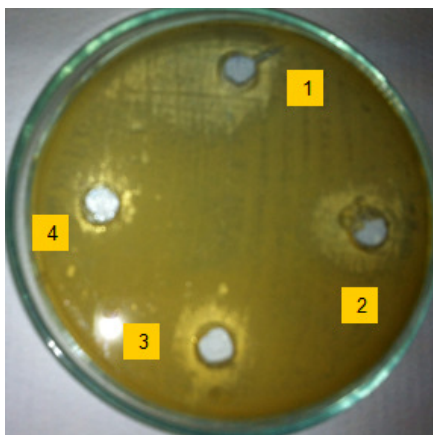


FIGURA 20 – PLACA DE ÁGAR PERFURADO, UTILIZANDO O MÉTODO DE DIFUSÃO POR MEIO DE ORIFÍCIO, MOSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. elata* FRENTE À BACTÉRIA *Candida albicans*

Fonte: Autor (2012)

NOTA: 1 = Óleo essencial (1:2); 2 = Óleo essencial (1:4); 3 = Óleo essencial (1:8) e 4 = Óleo essencial (1:16).

TABELA 20 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLES POSITIVOS*

Micro-organismos	(ZI mm)*						
	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	Tween 80 à 10%	Terbinafina	Cetoconazol
<i>Candida glabrata</i>	14 c	13 d	14 d	-	-	22 b	30 a
<i>Candida albicans</i>	39 a, b	19 a, b	17 a, b	12 b	-	31 a, b	52 a
<i>Candida tropicalis</i>	33,3 b, c	13 c	12,5 c	-	-	35 a, b	60 a
<i>Candida krusei</i>	18 b	-	-	-	-	20 b	35 a
<i>Trichosporon beigelli</i>	-	-	-	-	-	n	n

*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha (espécie de leveduras), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**Valores das regiões de inibição expressos em milímetros (mm), incluindo o diâmetro da cavidade de 8mm; (-) se refere à valores de inibição nulos; (n) se refere à amostras não testadas.

A *Candida tropicalis* apresentou sensibilidade aos dois padrões utilizados, bem como para as menores diluições realizadas, demonstrando melhores valores para os padrões-referência do que para as diluições óleo e resultado negativo para a maior diluição do óleo (1:16). Por fim a levedura *Candida krusei* apresentou sensibilidade para o óleo essencial apenas na menor diluição (1:2), estando esta

estatisticamente proporcional a atividade do padrão de referência Terbinafina e inferior ao cetoconazol.

Conforme analisado o óleo essencial de *E. elata* apresentou grandes possibilidades de uso e atividades estatisticamente semelhantes aos padrões-referência utilizados com frequência pela população, apresentando inclusive para algumas leveduras atividade superior aos padrões. Podendo estes apresentar menor atividade tóxica ao homem e substituir os antifúngicos utilizados comumente, bem como, podem ser utilizados com sinergismo no tratamento de infecções fúngicas, desta forma, estudos quanto sua toxicidade no organismo deverão ser realizadas, para que o óleo seja introduzido no mercado.

O resultado obtido pelo método de difusão, por disco ou orifício pode não corresponder com a realidade, servindo apenas como análise preliminar qualitativa, devido a natureza hidrofóbica do óleo essencial há certa dificuldade de dispersão deste no meio contendo ágar (ZANCHINO, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais apresentam uma composição bastante complexa, desta forma sua atividade antimicrobiana ou antifúngica dificilmente é atribuída, apenas a um componente presente no óleo, mas sim ao sinergismo dos compostos químicos presentes, podendo inclusive, em algumas situações apresentar efeitos antagônicos. Diversas espécies de *Eucalyptus* têm demonstrado importante atividade antimicrobiana e antifúngica como descrito por MALINOWSKI (2010), portanto a composição química dos óleos é um fator muito importante para o entendimento do mecanismo de ação e da atividade biológica dos óleos e as diferenças observadas nos valores do diâmetro do halo de inibição de crescimento provocados pelo óleo essencial para os diversos micro-organismos testados podem estar intimamente correlacionadas com os diversos mecanismos de resistência exercidos por cada um destes.

Sabe-se também que, a sensibilidade dos micro-organismos pode ocorrer pela interação de diversos componentes do óleo essencial, bem como, variabilidade na taxa de absorção e permeabilidade do componente ativo do óleo nas estruturas da levedura (SILVA, 2012).

5.6.3.2 Teste da microdiluição em caldo

Com os resultados obtidos na análise preliminar, decidiu-se estudar todos os extratos hidroalcoólicos das folhas, caule e cascas do caule, bem como o óleo essencial das folhas secas de *E. elata*, no teste da microdiluição em caldo, pois a vantagem da presente metodologia é que, diferente das análises de difusão em disco ou em cavidade, esta é uma análise quantitativa e pode ser utilizada tanto para amostras solúveis em água, quanto para as lipossolúveis (ZACCHINO, 2002).

Por meio desta análise foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de amostra que é capaz de inibir o crescimento dos diferentes micro-organismos, complementando assim os resultados obtidos pela técnica de difusão em meio sólido a partir de orifícios.

Neste ensaio é possível avaliar o crescimento de micro-organismos pela adição do revelador TTC (cloreto de trifênil tetrazólio), pois quando há presença de micro-organismos viáveis no meio, este composto reage com os íons de hidrogênio formados durante a respiração celular, resultando numa substância conhecida como “formazam”, uma substância insolúvel de coloração avermelhada (ANTONIO, 2011). A presente metodologia tem sido cada vez mais utilizada, pois apresenta boa sensibilidade e, por utilizar microplacas e indicadores químicos de crescimento de micro-organismo, minimizando o consumo e os gastos de amostras e reagentes, podendo também ser repetida em um número maior de vezes, o que aumenta a confiabilidade dos resultados (SILVA, 2012).

Sendo assim a presença da coloração avermelhada no meio de cultura possibilitou a leitura da microplaca e, com isso, a determinação da concentração inibitória mínima, como está representado na FIGURA 21.

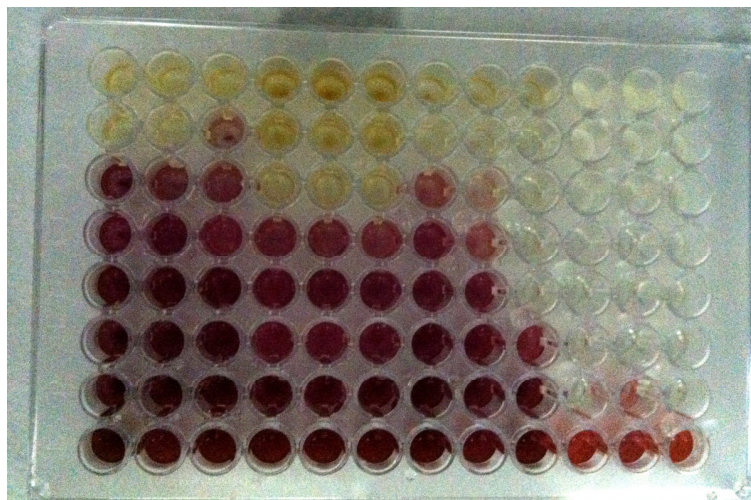


FIGURA 21 – MICROPLACA COM OS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS E CONTROLES FRENTE À BACTÉRIA *Proteus mirabilis*.
Fonte: Autor (2012)

Os valores de CIM e o tipo de atividade encontrada para os extratos do caule, cascas do caule, folhas e óleo essencial de *E. elata* estão demonstradas na TABELA 21 e 22. Os solventes utilizados para a diluição das amostras foram utilizados como controles negativos e tanto para o etanol 70% (v/v), quanto para o tween 80 (10%) obtiveram crescimento dos micro-organismos em todas as microplacas, o que indica que os mesmos não interferem no crescimento e, da mesma forma na atividade antimicrobiana ou antifúngica das amostras.

Os meios de cultura sem adição de micro-organismos foram utilizados como controle de esterilidade do meio e nestes não houve o crescimento dos mesmos, bem como também não houve crescimento dos mesmos nos controles positivos eritromicina 30 µg/mL para bactérias e cetoconazol 50 µg/mL, terbinafina 50 µg/mL para as leveduras, ressaltando a confiabilidade da análise e dos resultados obtidos nesta.

Os resultados obtidos foram classificados segundo Machado e colaboradores (2005), o qual propõe uma classificação para a atividade antimicrobiana/ antifúngica de acordo com a sua concentração inibitória mínima, desta forma, considera-se que valores de CIM menores do que 10 µg/mL correlacionam-se com uma atividade antimicrobiana excelente da amostra, valores entre 10 e 100 µg/mL apresentam boa atividade, valores entre 100 e 500 µg/mL indicam atividade moderada e por fim, valores acima de 500 µg/mL são considerados de atividade fraca ou nula.

Na análise dos extratos das folhas de *E. elata* frente às bactérias, foi possível verificar uma possível atividade antimicrobiana com o *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, que por sua vez apresentaram uma atividade considerada fraca ou nula, por demonstrarem a CIM entre 1000 e 2000 µg/mL, apresentando também atividade bacteriostática, bactericida e bacteriostática, respectivamente. Entretanto para a o microrganismo *Streptococcus pyogenes* obteve-se um CIM de 250 µg/mL, o que representa uma atividade antimicrobiana considerada boa e sua ação frente à bactéria foi bacteriostática, o que indica que este extrato possui capacidade apenas de inibir o crescimento de colônias bacterianas, não ocasionando a morte das mesmas.

Em relação à atividade do extrato do caule frente às bactérias, os resultados obtidos para as bactérias *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* foram considerados fracos ou nulos, pois os mesmos apresentaram uma CIM igual a 1000 µg/mL e ação bacteriostática, o microrganismo *Bacillus subtilis* apresentou um CIM igual a 2000 µg/mL, o que também revela uma atividade fraca, porém sua ação frente às bactérias foi bactericida. Este extrato demonstrou uma atividade boa apenas frente ao *Streptococcus pyogenes*, apresentando uma MIC de 500 µg/mL e revelou ação bactericida, o que indica que este extrato possui capacidade de ocasionar a morte das mesmas.

Entretanto, os resultados obtidos para as cascas do caule foram distintos dentre as bactérias testadas, sendo assim este extrato apresentou atividade fraca ou nula para *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Bacillus subtilis* demonstrando uma CIM acima de 500 µg/mL, porém quando se analisou o extrato frente às bactérias *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* obteve-se uma boa atividade, apresentando atividade bactericida apenas frente ao *Enterobacter aerogenes* e bacteriostática em todas as outras os outros micro-organismos analisados.

Pesquisando a atividade do óleo essencial em diferentes concentrações frente às bactérias, verificou-se que a única cepa que não apresentou sensibilidade ao óleo foi o *Enterococcus faecalis*, entretanto para as outras bactérias verificaram-se valores de CIM bastante baixos frente aos micro-organismos analisados, o que demonstra uma ótima atividade deste óleo. Frente à *Escherichia coli* e o *Streptococcus pyogenes* obteve-se um valor de CIM de 1:256, ou seja, na

concentração de 0,39% ele foi capaz de inibir o crescimento deste microrganismo, demonstrando assim uma excelente atividade antimicrobiana e exerceu ação bactericida frente às mesmas. Quando analisadas as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* apresentaram um valor de CIM de 1:128, mostrando que a concentração de 0,78% de óleo essencial foi o suficiente para apresentar atividade frente a estas bactérias, exibindo também uma excelente atividade, a ação que o óleo apresentou diante destas bactérias foi bacteriostática, bactericida e bactericida, respectivamente.

O valor de CIM do óleo essencial para o *Enterobacter aerogenes* foi de 1:64, o que mostra que uma concentração de 1,56% do óleo é suficiente para inibir o crescimento da mesma e apresentou atividade bactericida, entretanto quando o mesmo foi analisado frente ao *Bacillus subtilis* a CIM foi de 1:2, ou seja, uma concentração de 50% do óleo essencial foi necessária para demonstrar atividade, o que correlaciona com uma atividade fraca do mesmo e nesta concentração o óleo apresentou uma ação bactericida, matando assim as bactérias presentes no meio.

Conforme o resultado obtido nas análises pôde-se observar que mesmo em baixas concentrações foram evidenciadas a ação antimicrobiana do óleo essencial tanto para as bactérias Gram positivas, quanto para as bactérias Gram negativas, concluindo assim que o óleo essencial desta espécie de *Eucalyptus* apresenta potente atividade antimicrobiana e que na maioria de suas análises apresenta atividade bactericida.

Tanto o óleo essencial quando os extratos das folhas, caule e cascas do caule de *E. elata* não apresentaram nenhuma atividade frente ao *Enterococcus faecalis*, mesmo em diferentes concentrações, o que mostra a resistência desta bactéria por esta espécie de *Eucalyptus*.

TABELA 21 – CIM ($\mu\text{g/ml}$) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE *E. ELATA*, FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS

Micro-organismos	Amostras				
	GRAM	Óleo	Ext. Folhas	Ext. Caule	Ext. Cascas
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	1:128 Bacteriostático	NAA	NAA	1000 Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	1:256 Bactericida	NAA	NAA	1000 Bacteriostático
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	1:64 Bactericida	NAA	1000 Bactericida	1000 Bactericida
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	1:128 Bactericida	1000 Bacteriostático	1000 Bactericida	250 Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	1:128 Bactericida	1000 Bactericida	1000 Bactericida	500 Bacteriostático
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	NAA	NAA	NAA	NAA
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	1:256 Bacteriostático	250 Bacteriostático	500 Bacteriostático	500 Bacteriostático
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	1:2 Bactericida	2000 Bacteriostático	2000 Bacteriostático	1000 Bacteriostático

NAA = Não apresentou atividade antibacteriana

Analisando os resultados obtidos para o extrato das folhas frente às leveduras, observou-se que o mesmo apresentou atividade apenas para a *Candida glabrata* e *Trichosporon beigelli*, sendo estes resultados considerados de ação fraca ou nula, pois apresentaram uma CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Dentre os resultados obtidos para o extrato do caule obteve-se uma boa atividade para *Candida krusei* com uma CIM 250 $\mu\text{g/mL}$ e para o *Trichosporon beigelli* com uma CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$. Para as leveduras *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata* o extrato apresentou atividade fraca ou nula com um CIM de 1000 a 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Observando a ação do extrato das cascas do caule em relação às leveduras, verificou-se resultado positivo para todas as leveduras testadas e expressou atividade fungicida em todas as análises, apresentando ação fraca para a levedura *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, com um valor de CIM entre 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ e, entretanto para *Trichosporon beigelli* o extrato apresentou boa atividade apresentando uma CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$. Em todas as análises os extratos apresentaram atividade fungistática.

Em relação ao óleo essencial frente às leveduras, todas se apresentaram sensíveis ao mesmo. O óleo essencial frente às leveduras *Candida glabrata* e

Trichosporon beigelli foi o que apresentou melhor atividade, sendo esta considerada excelente, apresentando um CIM de 1:256, o que mostra que uma concentração de 0,39% do óleo é suficiente para inibir o crescimento das mesmas. As leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei* também apresentaram uma excelente sensibilidade ao óleo essencial, com um CIM de 1:32, ou seja, uma concentração de 3,13% do óleo essencial foi necessária para demonstrar atividade e por fim a levedura *Candida tropicalis* foi a que demonstrou menor sensibilidade ao óleo com um CIM de 1:16, demonstrando que na concentração de 6,25% ela se apresentou sensível a este óleo, o que correlaciona com uma atividade boa do mesmo. Em todas das análises o óleo apresentou uma ação fungistática, inibindo assim a proliferação das leveduras no meio de cultura.

De acordo com os resultado obtidos nas analises realizadas verificou-se que o óleo essencial apresentou potente poder fungistático, mesmo em baixas concentrações frente à todas as leveduras analisadas, demonstrando assim um grande potencial no tratamento de infecções causadas por fungos, denominadas por micoses, ampliando o espectro de ação do óleo essencial de *E. elata*, pois na maioria dos estudos os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* são analisados apenas frente à levedura *Candida albicans*.

Desta forma, o estudo se mostrou bastante relevante, pois sabe-se que algumas espécies de *Candida*, como a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, avaliadas neste estudo, são causadoras de infecções, das quais existem um grande índice de resistência aos medicamentos sintéticos disponíveis no mercado, com isso, podemos encontrar uma terapia alternativa aos medicamentos usados para o tratamento de infecções geradas por fungos, como o fluconazol, e outros azóis, que por serem extremamente metabolizados pelo fígado, podem apresentar o efeito adverso de hepatite e posteriormente, cirrose medicamentosa, bem como problemas endócrinos (ZACCHINO, 2002). Estudos mostram que a utilização de fluconazol com o intuito profilático em hospitais, aumentou a taxa de infecção e colonização por *C. glabrata* e *C. krusei* no local (MAERTENS; BOOGAERTS, 1996).

TABELA 22 - CIM ($\mu\text{g/ml}$) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE *E. ELATA*, FRENTE ÀS LEVEDURAS

Micro-organismos	Amostras			
	Óleo	Ext. Folhas	Ext. Caule	Ext. Cascas
<i>Candida glabrata</i>	1:256 Fungistático	1000 Fungistático	2000 Fungistático	1000 Fungistático
<i>Candida albicans</i>	1:32 Fungistático	NAA	2000 Fungistático	2000 Fungistático
<i>Candida tropicalis</i>	1:16 Fungistático	NAA	1000 Fungistático	1000 Fungistático
<i>Candida krusei</i>	1:32 Fungistático	NAA	250 Fungistático	1000 Fungistático
<i>Trichosporon beigelli</i>	1:256 Fungistático	1000 Fungistático	500 Fungistático	125 Fungistático

NAA = Não apresentou atividade antifúngica ou fungicida

A atividade positiva do óleo essencial para as diferentes espécies de leveduras pode estar diretamente ligada à presença de polifenóis, como o grupo dos metabólitos secundários flavonóides e taninos, como também os esteróides e/ou triterpenos presentes tanto nas folhas, caule e cascas do caule desta espécie.

Óleos essenciais que apresentam o mesmo poder antimicrobiano podem não possuir os mesmo componentes majoritários, sendo assim eles podem agir de maneira distinta frente aos micro-organismos e, desta forma a elucidação da composição química é fundamental para a explicação da atividade biológica do óleo essencial, porém o sinergismo dos componentes presentes na planta dificulta a atribuição da ação a um único composto.

Harris (2002) comprovou que em espécies de *Eucalyptus*, os componentes em maior concentração como o α -pipeno e o 1,8- cineol são relativamente inativos em relação à atividade biológica, sendo assim os que possuem a atividade são os compostos em minoria e que por sua vez devem agir em sinergismo (FRANCO, 2005). Vilela e col. (2009) também comprovaram esta correlação, em seu estudo verificaram a atividade antifúngica do 1,8-cineol, composto majoritário presente no óleo essencial de *E. globulus*, e observaram que o mesmo só apresentou a atividade na maior concentração testada, mostrando que, nem sempre o composto em maior concentração está diretamente correlacionado com a atividade biológica, podendo ainda haver um sinergismo entre os compostos de maior e de menor concentração. Sacchetti e col. (2005) observaram que óleos ricos em fenóis, aldeídos e alcoóis apresentam boa atividade contra fungos e leveduras. Fato que, também, foi observado por Cimanga e col. (2002), o qual alegou que a presença de compostos

como alcoóis, aldeídos, alcenos, ésteres e éteres nos óleos essenciais podem influenciar na atividade antimicrobiana dos eucaliptos.

Sabe-se que a sinergia entre compostos também pode ocorrer, em seu estudo Low, Rawal e Griffin (1974) observaram que de a ação antibacteriana associada dos compostos citronelal e citronelol, presentes no óleo essencial de *E. citriodora* foi superior quando comparadas a ação dos mesmos quando avaliados isoladamente, sendo efetivamente comprovados por Pattnail e col. (1997), os quais conseguiram comprovar que a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *E. globulus* é menor na essência bruta do que nos compostos majoritários isolados. Sartorelli e col. (2007) atribuíram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *E. robusta* à alta concentração de monoterpenos como o α -, β -pipeno e limoneno. Segundo Gilles e col. (2010) óleo essencial de *E. staigeriana* frente à levedura *C. albicans*, esteve diretamente correlacionado com a presença de do linalol, terpineno, *p*-cimeno, α -pipeno, e α -terpineol, que mesmo em baixas concentrações contribuíram para a ação.

A análise e identificação dos compostos presentes no óleo essencial ainda deverá ser realizada para a que seja possível o desenvolvimento de um produto de uso tópico, visto que a permeabilidade de óleos essencial é extraordinária e não apresentaria dificuldades, como demonstrado por Harris (2002), o qual utilizou monoterpenos, como o 1,8-cineol para auxiliar na penetração e aumentar a eficácia de medicamentos tópicos, como o tamoxifeno, utilizado na terapia pós-cirúrgica de câncer mamário.

5.6.4 Atividade Hemolítica

5.6.4.1 Determinação da atividade hemolítica em placas de ágar sangue de carneiro

Esta análise foi realizada em placas de ágar sangue produzidas no próprio laboratório, utilizando como amostras os extratos brutos das folhas, caule e cascas do caule e suas respectivas frações e o óleo essencial de *E. elata*.

Foi obtido resultado positivo para atividade hemolítica apenas para o óleo essencial, apresentando um halo de hemólise de 18,3 mm \pm 1,69, sendo que este resultado corresponde a média da triplicada mostrada na TABELA 23, incluindo o

desvio padrão e sabendo-se que o diâmetro do disco estéril corresponde a 6 mm, sendo também demonstradas na FIGURA 22.

TABELA 23 - MÉDIA DOS VALORES OBTIDOS PARA TESTE PRELIMINAR DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL *E. elata*.

Halo de hemólise do óleo em mm
19,0 mm
16,0 mm
20,0 mm
Média: 18,3 mm
Desvio padrão: 1,69
Valores expressos em média \pm desvio (n=3)

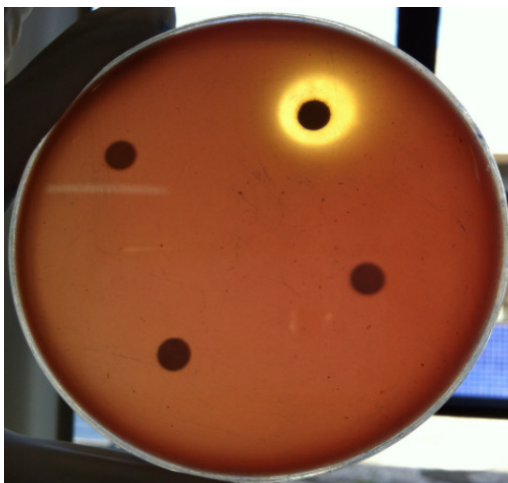


FIGURA 22 - PLACA DE ÁGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. elata*

Fonte: Autor (2012)

Pelo teste ter apresentado atividade positiva para o óleo essencial, seguiram-se as análises para realizar a avaliação preliminar da toxicidade tanto para o óleo essencial, como também para todos os extratos e frações de *E. elata*.

5.6.4.2 Determinação da atividade hemolítica em tubos sangue de carneiro a 2%

Esta análise tem importância na identificação de novos fitoterápicos, uma vez que a Farm. Bras. (2010) e a OMS (1998) preconizam que os resultados encontrados nos ensaios para análise da atividade hemolítica dos extratos de

plantas refletem a atividade toxicológica destas e recomenda que os ensaios toxicológicos sejam realizados conforme descrito no guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos (ANVISA, 2003).

As saponinas são glicosídeos de esteróis ou de terpenos policíclicos, sendo considerados compostos anfifílicos ou seja, possui em sua estrutura uma parte com característica hidrofílica (açúcares), e outra parte lipofílica (triterpeno ou esteróide). Dentre as diversas atividades biológicas deste grupo de metabólitos secundários presentes em algumas plantas destacam-se: a atividade hemolítica, citotóxica, molusquicida e anti-helmíntica. Quando se tratam de atividades farmacológicas realizam o aumento da excreção do colesterol, pela formação de complexo com as saponinas administradas por via oral ou por aumentar a eliminação de ácidos biliares nas fezes, sendo assim hipocolesterolemiantes (SIMÕES *et al.*, 2010).

5.6.4.3 Teste preliminar para determinação da atividade hemolítica em tubos sangue de carneiro a 2%

Segundo Meyer e col. (1982) para a amostra ser considerada ativa em relação a toxicidade deverá apresentar DL 50 inferior a 1000 µg/ mL, sendo assim o dado obtido por esta análise é de grande importância para a determinação da dose letal (DL₅₀) para o uso do fitoterápico em questão.

A este ensaio que avalia a atividade hemolítica em sangue de carneiro foram submetidas às amostras de extratos brutos das folhas, caule e cascas do caule, bem como o óleo essencial das folhas de *E. elata*, seguindo a técnica sugerida por Flanch e col. (2005).

Neste teste, nenhuma das amostras referidas apresentou resultado positivo para a ruptura dos eritrócitos ocasionando liberação da hemoglobina, ou seja, hemólise total que é representada por uma solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos

Sendo que, após os 5 minutos de centrifugação 3000 RPM, os tubos apresentaram uma solução transparente e com presença de precipitado, indicando a presença de eritrócitos no fundo do tubo de ensaio, indicando assim que as amostras analisadas não apresentam atividade hemolítica, com isso, não houve a

necessidade de complementar o teste da atividade hemolítica com o teste principal, que utiliza as amostras em maiores diluições.

Como houve divergências entre os resultados obtidos para o óleo essencial em placas de ágar sangue de carneiro, o qual apresentou resultado positivo para atividade hemolítica e nos tubos de solução de sangue de carneiro a 2%, o qual não apresentou atividade hemolítica, sugere-se que sejam realizados outros testes para que se possa confirmar a possível atividade hemolítica do óleo essencial de *E. elata*.

Nos resultados obtidos das análises fitoquímicas não foi constatada a presença da classe dos alcalóides, sendo estes representantes do metabolismo secundário de plantas para a sua defesa, tendo como característica de serem os principais responsáveis pela toxicidade destas, podendo provocar sérios danos ao organismo humano, pois através da hemólise ocorre a liberação de hemoglobina livre no plasma, podendo proporcionar danos severos a órgãos vitais como fígado, rins e coração (CARVALHO *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

As folhas secas de *Eucalyptus elata* apresentaram um excelente potencial de rendimento de óleo essencial (5,4 mL%) em comparação com as folhas frescas (2,7 mL%).

A análise fitoquímica realizada com os extratos das folhas, caule e cascas do caule confirmou a presença de flavonóides, esteróides e/ ou triterpenos, glicosídeos saponínicos e antociânicos, taninos, leucoantocianidinas e aminogrupos.

Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, o melhor resultado encontrado em relação ao padrão-referência ácido gálico, foi a fração acetato de etila das cascas do caule.

Pela metodologia do DPPH, a fração butanol das folhas e o extrato bruto das cascas do caule mostraram um maior valor de percentagem de atividade antioxidante, valor este superior aos encontrados para os padrões-referência, ácido ascórbico, rutina e ácido gálico. Neste ensaio, a fração acetato de etila e butanol das cascas revelou o valor de CE₅₀ próximo ao encontrado para o padrão-referência rutina.

Os extratos das folhas, do caule e das cascas do caule apresentaram atividade antimicrobiana fraca a moderada, porém o óleo essencial exibiu resultados promissores, frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas, assim como para as leveduras, apresentando baixos valores de CIM.

Atividade hemolítica foi encontrada no óleo essencial das folhas pelo teste da difusão, entretanto o ensaio em tubos de sangue, não se confirmou, sendo necessária a realização de novas análises para confirmação dos resultados.

E. elata apresentou um potencial biológico interessante devendo ser aprofundado, principalmente no que diz respeito a sua capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas e antifúngicas, na busca da formulação de novos medicamentos fitoterápico com segurança, eficácia e qualidade.

Avaliando os resultados obtidos, são recomendadas pesquisas adicionais para dar continuidade com aos estudos com esta espécie, sugerindo também, o isolamento de compostos, que podem ser encontrados novos princípios ativos para o tratamento de diversas patologias.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR 5784**: Óleos essenciais, determinação da massa específica e densidade relativa, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985a. 3p.

ABNT. **NBR 5785**: Óleos essenciais, determinação do índice de refração, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985b. 2p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem I Oswaldo Cruz**, v.95, p. 367-373, 2000.

ANTONIO, R. D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis*, Beuzev. & Welch., Myrtaceae**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.517-524, 2006.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 90-97, 2008.

BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization on 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 226-231, 2009.

BARBOSA, V. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo** 85f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T. **Comparative Biochemistry**. New York, Academic Press, 1962.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n.12, p. 2166-2174, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, n. 181, p. 1199-1959, 1958.

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. ***Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage, Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOSCARDIN, P. M. D. **Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BRAGA, N.C. **Os óleos essenciais no Brasil: estudo econômico**. Rio de Janeiro: Instituto de Óleos, 1971.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S.A., 1991.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223–253, 2004.

CARVALHO, E.B. **Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos**. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, p. 109, 2007

CHÉRAIF, I.; JANNET, H. B.; JANNNET, H. B. ; HAMMAMI, M. ; KHOUJA, M. L.; MIGHRI, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p.813 – 820, 2007.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J. ; PIETERS, L. ; VLIETINCK, A. J. Correlarion between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 213-220, 2002.

CINIGLIO, G. **Eucalipto para a produção de óleos essenciais**. Piracicaba: ESALQ/ USP/ Departamento de Ciências Florestais, 1993.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.11,n.1,p.47-52, ago./ dez. 2004.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 701p.

DALMARCO, J. B. **Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel: Análise Fitoquímica e Atividade Biológica**. 91f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

DORAN, J.C. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, 1991. p. 11-28.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESES, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELDRIDGE, K. G.; et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford University Press 1994.

EVANS, W. C. **Trease and Evans pharmacognosy**. 14^a ed. London: W. B. Saunders, 1996. 612 p.

FABROWSKI, F. J. **Eucalyptus smithii R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ UFRGS, 2007, p. 163-179.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/ UFRGS, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5^a ed. Brasília, 2010. Volume I.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C. P.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. & C.; RAMALHO, R. M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.27-31, 2010.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. *In*: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, 2002. p.317-334.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p.291-296, 2005.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. v. Muell. Ex. Benth., Myrtaceae**. Curitiba, 2005. 70f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GILLES, M.; ZHAO, J.; NA, M. AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils off three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 731-737, 2010.

GLOWNIAK, K.; SKALICKA, K.; LUDWICZUK, A.; JOP, K. Phenolic compounds in the flowers of *Lavatea trimestris* L. (Malvaceae). **Journal of Planar Chromatography**, v. 18, p.264-268, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GUEHO, E.; IMPROVISI, L.; de HOOG, G. S; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, n. 1-2, p. 3-10, 1994.

GUENTHER, E. The essential oils (Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbellifeae and Geraniaceae). 3 ed. New York: Van Nostrand, 1961. v.4.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, I. F. F. R. Contribution of essencial oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products, antiviral e hipoglucemiante**. México: Instituto Politécnico Nacional, p. 192, 2010,

HANAMANTHAGOUA, M.S.; KAKKALAMELI, S.B.; NAIK, P.M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H.R.; MURTHY, H.N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v.118, n.3, p. 836-839, 2010.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992, **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. The International Journal of Aromatherapy, v. 12, n. 4, p. 179-186, 2002.

JACOBS, M.R. **Growth habits of the *Eucalyptus***. Forest and Timber Bureau, Commonwealth of Australia, Canberra, p. 262, 1955.

JOHANN, S.; PIZZOLATII, M.G.; DONIICI, C.L. RESENDE, M. A. de. Antifungal properties of plants used in Brazilian tradicional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Mycrobiology**, v.38, n.4, p. 632-637, 2007.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7.ed.São Paulo: Nacional , 1985. p. 504-505

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1966.

JURD, L.; GEISSMAN, T.A. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v.21, n.12, p.1395-1401, 1956. Abstract

KASHIWADA Y., WANG H. K., NAGAO T., KITANASAKA S., YASUDA I., FUJIOKA T., YAMAGISHI T., COSENTINO L. M., KOSUKA M. Anti HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Productin**, v. 61, p. 1090-1095, 1998.

KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; ZYGADLO, J. A. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: BERGER, R.G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlim: Springer, 2007. p. 87-117.

LASSAK, E. V. The Australian *Eucalyptus* oil industry, past and present. **Chemistry in Australia**, v. 55, p. 396-398, 1988.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, p.481-501, 2002.

LOW, D.; RAWAL, B. D.; GRIFFIN, W. J. Antibacterial action of essential oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of oil of *Eucalyptus citriodora*. **Planta Medica**, v. 26, p. 184-189, 1974

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACHADO T. B., PINTO A. V., PINTO M. C. F. R., LEAL I. C. R., SILVA M. G., AMARA C. F., KUSTER L. R. M., NETO K. R.. *In vitro* activity of brasilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analougues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 23, p. 279-284, 2003

MAERTENS, J. A.; BOOGAERTS, M. A. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. *Current Pharmaceutical Design*. v. 6, n.2, p. 199-211, 1996.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. Subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J. B. Kirkpat., Myrtaceae.** 117f f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2010.

MANTERO, C.; GARCIA, C.; RODRÍGUEZ, P.; ESCUDERO, R.; PRIORE, E.; MENÉNDEZ, P. Potencialidad para produccíón de aceites esenciales em espécies *Eucalyptus* cultivadas em Uruguay. **Agrociencia**, v. 11, n.2, p. 17-23, 2007.

MARGULES, C.R.; STEIN, J.L. Patterns in the Distributions of Species and the Selection of Nature Reserves: An Example from *Eucalyptus* Forests in South-eastern New South Wales. **Biological conservation**, v. 50, p. 219-238, 1988.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.45, p.31, 1982

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F., PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOSQUERA, O. M.; CORRERA, Y. M.; NIÑO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.382-387, 2009.

NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique évaluation dès activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N. B. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** 198f. These INP, Toulouse, France, 1993.

NASCIMENTO G. G. F., LOCATELLI J., FREITAS P. C. D., SILVA G. L. Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Information supplement 15th M100-S15. Wayne. PA: NCCLS/CLSI, 2005/CLSI. 2005.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T.. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 553-556, 2009.

ÓLEOS essenciais de eucalipto. **Revista da Madeira**, n.75, 2003. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=407&subject=%D3leos%20Essenciais&title=%D3leos%20essenciais%20de%20eucalipto>. Acesso em: 23/04/2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Quality control methods for medicinal plants methods, p. 41-43, 1998.

PATTNAIL, S.; SIMSEK, B.; KULEASAN, H. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbioscience**, v. 83, p. 39-46, 1997.

PENFOLD, A.R. **The eucalypts: botany, cultivation, chemistry and utilization**. London Leonardo Hill, 1961.

PHARMACOPEA Helvetica. 7. ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993. Suppl., v. 4-6, 1990.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

ROBARDS, K, Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v. 100, p.657-691, 2003

ROBINSON, T. **The organic constituents of higher plants: their chemistry and interrelationships**. 6th ed. North Amherst: Cordus Press, 1991.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias v.2, n.2, p.23-34, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico 127 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1 ed. Online. Fortaleza-Ce, 2007

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin

as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, v.91, p.621–632, 2005.

SANNOMIYA, M. et al., A Flavonoid Glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p.237-239, 1998

SANTOS, R. L. **The Eucalyptus of California**. California: California State University, 1997.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n.3, p.231-233, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. O.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ UFRGS, 2007, p. 711-740.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination os antifungal activity os natural products against medical yeasts *Candida* sp. And *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n.3, p. 391-397, 2007.

SHIVA, V.; PADHYAY, J. B. Inventário **Ecológico sobre o cultivo do eucalipto**. Belo Horizonte : CPT/MG, 1991.

SILVA, S. M. **Morfoanatomia, identificação química e determinação de bioatividades dos óleos essenciais e extratos de folhas, flores e frutos de Eucalyptus cinerea F. MUELL. Ex BENTH., MYRTACEAE**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; SILVA JÚNIOR, F. G. Potential of eleven Eucalyptus species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SILVA, S. M.; ABE, S. Y.; MURAKAMI, F. S.; FRENSCH, G.; MARQUES, F. A.; NAKASHIMA, T. Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. **Pharmaceuticals**, v.4, n.12, p.1535-1550, 2011.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; DA CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/ SC: Editora da UFSC/UFRGS, 2010. p. 467-496.

SINGER, O. **Camomila**. Monografia. Curso de Especialização em Ciências Farmacêuticas. UFPR, 50p, 2005.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

USP XXVIII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VANZIN, S. B.; PIRES, C. **Entendendo Cosmecêuticos**: Diagnósticos e tratamentos. 2. Ed. São Paulo. Editora Santos, 2011, p. 87

VÁSQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE, M. S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v.28, p. 279-285, 2008.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N. R.; BORGES, J. H. S.; VINCENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n.1, p.65-74, jan-jun 2008.

VELJIC, M.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; JANACKOVIC, P.; MARIN, P. D. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. **Archives of Biological Sciences, Belgrade**, v.62, n.2, p. 381-395, 2010.

VILELA, G. R.; ALMEIDA, G. S. de; D'ARCE, M. A. B. R.; MORAES, M. H. D.; BRITO, J. O.; SILVA, M. F. G. F.; SILVA, S. C.; PIEDADE, S. M. S.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLORIA, E. M. da. Activity of essential oil and its major compound, 1,8- cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 2, p. 108-111, 2009.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 23f (Documentos 17).

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

WANG, C. K.; LEE, W. H.; PENG, C. H. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 1185-1188, 1997.

WANG, K.; PAN, Y.; WANG, H.; ZHANG, Y.; LEI, Q.; ZHU, Z.; LI, H.; LIANG, M. Antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf extracts. **Medicinal Chemistry Research**, v.19, p.166–176, 2010.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p. 1-112, 1963.

World Health Organization (WHO). Traditional medicine, 1998. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>>, Acesso em: 10/04/ 2011.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novo agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, 2002. p.435-479.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p.489-516.